

Struktur und Entwicklung benthischer Biofilme in Fließgewässern - Messungen und Simulation

vorgelegt von
Diplom-Biologin Annett Eitner
aus Magdeburg

an der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. M. Kraume

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Szewzyk

Gutachter: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 27.02.2004

Berlin 2004

D 83

Vorwort

Diese Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie von Grenzflächen der Sektion Gewässerforschung. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und so zum Gelingen dieser beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas R. Neu für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Sein fachlicher Rat und die zahlreichen Diskussionen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. U. Szewzyk, dem Leiter des Fachgebiets Ökologie der Mikroorganismen, danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. H. Horn danke ich für das große fachliche Interesse an meiner Arbeit und seine hilfreiche Unterstützung, vor allem auf dem Gebiet der Modellierung und der Mikroelektrodenteknik. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Ganz besonders möchte ich Ute Kuhlicke für die gute Zusammenarbeit und stetige Unterstützung während meiner gesamten Arbeit am UFZ danken. Etliche Stunden haben wir zusammen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop verbracht. Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern/innen der AG Grenzflächenmikrobiologie für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfe bei Laborarbeiten.

Ein großes Dankeschön gilt allen Mitarbeitern/innen, die mir bei den Probenahmen an der Ehle geholfen haben, insbesondere seinen dabei erwähnt Hans-Joachim Dahlke, Corinna Völkner, Martin Wieprecht, Luz Paje und Iris Brookland. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern/innen der Abteilung Chemie der Sektion Gewässerforschung für die chemische Aufbereitung und Analyse meiner Proben bedanken. Andreas Müller danke ich für seine Hilfe bei der Bestimmung des Makrozoobenthos.

Für die Entwicklung des Quantifizierungsprogramms Microstat sowie unsere gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Steven Bergner aus der Arbeitsgruppe Bildverarbeitung/Bildverstehen der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg bedanken. Weiterhin haben mir Martin Tröger sowie Olaf Büttner geholfen die Quantifizierungsprogramme Scion Image bzw. Comstat für unsere Bildformate anzupassen, wofür ich mich bei ihnen bedanken möchte.

Für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meines Aufenthaltes am National Water Research Institute, Saskatoon (Kanada) danke ich Dr. John Lawrence und George Swerhone. Durch ihre Hilfe und Gastfreundschaft wird mir die Zeit in Saskatoon immer angenehm in Erinnerung bleiben.

Ich möchte mich bei allen meinen Freunden bedanken, die ich am UFZ gefunden habe. Sie haben mich jederzeit unterstützt und eine freundliche kreative Arbeitsatmosphäre geschaffen. Ich werde die vielen Gespräche, Diskussionen und gemeinsamen Mittagspausen vermissen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund, meinen Eltern sowie meiner Schwester für ihre unaufhörliche Unterstützung und ihr Verständnis.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung/Zielstellung	6
1.1	Biofilme	6
1.1.1	Vorkommen und Bedeutung der Biofilme	6
1.1.2	Benthischer Biofilm in Fließgewässern	7
1.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie und Bildanalyse	8
1.2.1	Funktionsweise des konfokalen Laser Scanning Mikroskop	8
1.2.2	Bildanalyse	9
1.3	Mikroelektroden	11
1.4	Biofilmmodellierung	12
1.5	Aufgabenstellung	13
2	Material /Methoden	14
2.1	Untersuchungsgebiet	14
2.1.1	Standortparameter	15
2.1.2	Wasseranalysen	15
2.1.3	Makrozoobenthos	16
2.1.4	Untersuchungsgebiet am South-Saskatchewan-River	16
2.2	Biofilmuntersuchungen	16
2.2.1	Jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms	16
2.2.2	Einfluss der Hydrodynamik und der Nährstoffbedingungen auf die Biofilmstruktur und Biofilmentwicklung	17
2.2.2.1	Biofilmuntersuchungen in Rotating Annular Reaktoren (RAR)	17
2.2.2.1.1	RAR-Experiment 1: Biofilmentwicklung im Rotating Annular Reaktor und der Einfluss der Hydrodynamik auf die Biofilmstruktur	18
2.2.2.1.2	RAR-Experiment 2: Einfluss von Ammonium auf die Biofilmentwicklung und die Biofilmstruktur	19
2.2.2.2	Biofilmproben aus dem South-Saskatchewan-River, Kanada	19

2.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie und Bildanalyse	19
2.3.1 Probenvorbereitung und Färbung	20
2.3.2 Detektion der Fluoreszenzsignale	20
2.3.3 Mikroskopeinstellungen	21
2.3.4 Bildanalyse	22
2.3.4.1 Vergleich von Bildanalyseprogrammen	22
2.3.4.2 Segmentierungsalgorithmen	23
2.4 Sauerstoffprofile und photosynthetische Aktivität	24
2.5 Modellierung mit AQUASIM	27
2.5.1 Simulation der jahreszeitlichen Entwicklung von Fließgewässerbiofilmen	28
2.5.2 Simulation der Sauerstoffkonzentrationsprofile und der photosynthetischen Aktivität im benthischen Biofilm	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Untersuchungsgebiet	34
3.1.1 Standortparameter	35
3.1.2 Wasseranalysen	35
3.1.3 Makrozoobenthos	38
3.2 Mikroskopie und Bildanalyse	43
3.2.1 CLSM	43
3.2.2 Bildanalyse	45
3.2.2.1 Vergleich von Bildanalyseprogrammen	45
3.2.2.2 Einfluss der Schwellenwerte	48
3.3 Biofilmuntersuchungen	52
3.3.1 Vergleich von Biofilmen gewachsen auf natürlichen und künstlichen Substraten	52
3.3.2 Jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms	53
3.3.3 Einfluss der Hydrodynamik und der Nährstoffbedingungen auf die Biofilmstruktur und Biofilmentwicklung	65
3.3.3.1 RAR-Experiment 1: Biofilmentwicklung im Rotating Annular Reaktor und Einfluss der Hydrodynamik auf die Biofilmstruktur	65

3.3.3.2	RAR-Experiment 2: Einfluss von Ammonium auf die Biofilmentwicklung und die Biofilmstruktur	68
3.3.3.3	Einfluss der Hydrodynamik auf natürliche Biofilme aus dem South-Saskatchewan-River	72
3.4	Modellierung mit AQUASIM	76
3.4.1	Simulation der jahreszeitlichen Entwicklung von Fließgewässerbiofilmen	76
3.4.2	Simulation der Sauerstoffkonzentrationsprofile und der photosynthetischen Aktivität im benthischen Biofilm	80
4	Diskussion	84
4.1	Mikroskopie und Bildanalyse	84
4.2	Biofilmuntersuchungen	85
4.2.1	Vergleich von Biofilmen gewachsen auf natürlichen und künstlichen Substraten	85
4.2.2	Jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms	86
4.2.3	Einfluss der Hydrodynamik und der Nährstoffbedingungen auf die Biofilmstruktur und Biofilmentwicklung	91
4.3	Modellierung mit AQUASIM	95
4.3.1	Simulation der jahreszeitlichen Entwicklung von Fließgewässerbiofilmen	95
4.3.2	Simulation der Sauerstoffkonzentrationsprofile und der photosynthetischen Aktivität im benthischen Biofilm	97
5	Zusammenfassung	99
6	Summary	101
7	Abkürzungsverzeichnis	103
8	Literatur	105

1 Einleitung

Die Erforschung der Dynamik von Fließgewässern erfährt in den letzten Jahren neue Impulse. Die Bedeutung dieser Gewässer für die Umwelt und den Menschen führte sowohl zu großskaligen Untersuchungen ganzer Fließgewässersysteme und ihrer Einzugsgebiete als auch zu detaillierten Untersuchungen von Stofftransport- und Stoffumwandlungsprozessen innerhalb weniger Mikrometer an der Sedimentoberfläche. Die Entwicklung von neuen Mikroskopen und Untersuchungsmethoden ermöglicht nun eine eingehende Untersuchung der benthischen Mikroorganismengemeinschaft. Immer häufiger wird versucht die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zu verknüpfen und in einem Modell darzustellen. Dieses erfasst und berücksichtigt die wichtigen Prozesse und Einflüsse im untersuchten System. Solche Modelle ermöglichen ein besseres Verständnis komplexer Systeme zum Beispiel von Fließgewässern. In vielen Fließgewässernmodellen wird der benthische Biofilm jedoch nicht berücksichtigt. Untersuchungen zur Struktur und Entwicklung des benthischen Biofilms sind deshalb dringend erforderlich, um ihn als Kompartiment in die Modellierung von Fließgewässern zu integrieren und somit die Fließgewässergütemodelle zu optimieren.

1.1 Biofilme

Biofilme sind auf der Erde weit verbreitet, man findet sie nicht nur in der Natur (Stal & Caumette 1994, Krumbein et al. 1994) sondern ebenfalls im täglichen Leben, im medizinischen Bereich (Doyle & Ofek 1995, An & Friedman 2000) sowie in fast allen technischen Anlagen (Costerton et al. 1987, Bryers 2000). Trotzdem werden Biofilme erst seit rund 30 Jahren intensiver erforscht (Characklis 1973a, 1973b, Marshall 1976), nachdem erstmals die Adhäsion von Mikroorganismen an Oberflächen sowie ihre Wechselwirkungen mit diesen beschrieben wurden (ZoBell 1943).

Characklis und Marshall definieren in ihrem 1990 veröffentlichten Buch „Biofilms“: „Biofilme bestehen aus Zellen angeheftet an einer Oberfläche und meist eingebettet in einer organischen polymeren Matrix von mikrobiellem Ursprung „ (Characklis & Marshall 1990b).

Mikroorganismen besiedeln Grenzflächen aller Art, bevorzugt werden feste Oberflächen im wässrigen Milieu. Es können jedoch auch Grenzflächen zwischen Wasser und Luft oder auch zwischen fester Materie und Luft besiedelt werden. Nach der Ansiedlung werden von den Mikroorganismen extrazelluläre Substanzen ausgeschieden, die eine Matrix bilden wodurch sich die Überlebensbedingungen für die Organismen entscheidend verbessern. Dadurch können auch Habitate besiedelt werden, die sehr ungünstige Lebensbedingungen aufweisen (Krumbein & Villbrandt 1993). Die Biofilmmatrix besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlichsten Stoffen, wie z.B. Polysaccharide, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren. Zusammen werden sie als extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) bezeichnet. Sie besitzen eine Vielzahl von Funktionen und sind entscheidend für die Struktur und die Eigenschaften von Biofilmen (Wingender et al. 1999).

1.1.1 Vorkommen und Bedeutung der Biofilme

In Fließgewässern bilden sich Biofilme auf allen verfügbaren Oberflächen, z.B. auf Sediment, Steinen, Holz, Laubblättern, Makrophyten sowie auf Schwebstoffen. Diesen Biofilmsystemen wird eine große Bedeutung bei den Selbstreinigungsprozessen zugesprochen. In großen Flüssen und Strömen erfolgt der mikrobiologische Umsatz vor allem durch Mikroorganismen

auf Schwebstoffen, während in kleinen Fließgewässern dem benthischen Biofilm die größte Bedeutung beigemessen wird (Boyle & Scott 1984, Lock 1993, Pauer & Auer 2000).

Das Potential des benthischen Biofilms zur Reduzierung von Nährstoffkonzentrationen aus dem Flusswasser sowie zum Abbau von Schadstoffen wird auch in der Abwasserreinigung genutzt. Verschiedene Typen von Biofilmreaktoren (z.B. Tropfkörper, Biofilter, Fließbettreaktoren) kommen bei der Abwasserbehandlung zum Einsatz (Hall 1987, McDonald 1990, Iza 1991).

Neben dieser gewollten Anzucht von Biofilmen gibt es jedoch auch viele Bereiche in denen das Auftreten von Biofilmen große Probleme verursacht. Der Bewuchs von Biofilmen führt zu erheblicher Verschmutzung und Korrosion in industriellen Anlagen (Melo et al. 1992, Geesey et al. 1994). Außerdem verringern Biofilme zum Beispiel in Kühlkreisläufen erheblich die Effizienz (Characklis & Marshall 1990a) und können durch Verstopfung von Rohrleitungen große Störungen verursachen. Ebenfalls besiedeln Mikroorganismen die Leitungen von Trinkwassersystemen (Kalmbach et al. 1997, Kalmbach 1998). Dies kann nicht nur zu technischen sondern auch zu hygienischen Problemen führen (Block 1992). Im medizinischen Bereich stellen Biofilme eine hohe Infektionsgefahr dar, sie treten in Kathetern, in medizinischen Apparaturen und an Implantaten auf (Schlessinger 1982, An & Friedman 2000). Durch die hohe Resistenz und Widerstandskraft der Mikroorganismen in Biofilmen gegen Antibiotika (Nickel et al. 1985) und Desinfektionsmittel ist es fast unmöglich das Wachstum von einmal vorhandenen Biofilmen in medizinischen und technischen Anlagen zu verhindern.

1.1.2 Benthischer Biofilm in Fließgewässern

Die Erforschung des benthischen Biofilms reicht sehr lange zurück. Bereits 1945 untersuchte Young die benthische Mikroorganismengemeinschaft und prägte dafür den Begriff Periphyton (Young 1945). Da neben photoautotrophen Mikroorganismen auch heterotrophe Mikroorganismen einen bedeutenden Anteil im benthischen Biofilm besitzen, wurde in den letzten 10 Jahren verstärkt der Begriff Biofilm dafür verwendet.

Untersuchungen zeigten, dass die benthische Mikroorganismengemeinschaft in bestimmten Süßwassersystemen den größten Anteil an der Primärproduktion liefert (Wetzel 1964). Ihre Zusammensetzung und Verteilung wurde in den kommenden Jahren eingehend untersucht. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie erhielt man erste Einblicke in die dreidimensionale Struktur dieser Mikroorganismengemeinschaft gewachsen auf den unterschiedlichsten Substrata, wie zum Beispiel Makrophyten (Allanson 1973), Holz (Cundell & Mitchell 1977), Steinen (Tuchman & Stevenson 1980, Perkins & Kaplan 1987) und Plastikplatten (Hudson & Bourget 1981).

Die Besiedlung neuer Oberflächen in Fließgewässern findet in sehr kurzer Zeit statt. Nach nur 2 Stunden entwickelt sich ein Primärfilm bestehend aus organischem Material, Bakterien und Pilzen auf der Oberfläche (Korte & Blinn 1983). Dieser Primärfilm erleichtert die Besiedlung und schafft bessere Voraussetzungen für das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen (Paerl 1980). Kurz darauf kommt es zur Akkumulation von horizontal anhaftenden monoraphiden Diatomen (Korte & Blinn 1983). Ihre Fähigkeit zur Bildung von Mucilage gibt ihnen die Möglichkeit einer frühen Besiedlung durch eine gute Anhaftung an Oberflächen (Hudson & Bourget 1981). Durch die weitere Ansiedlung von Algenfilamenten und vertikal orientierten Diatomen bildet sich nach kurzer Zeit eine komplexe dreidimensionale Struktur.

Der benthische Biofilm zeigt eine hohe Vielfalt in seiner Zusammensetzung, welche von verschiedenen Einflussfaktoren bestimmt wird. Eine Verschiebung der Anteile von photoautotrophen und heterotrophen Mikroorganismen kann durch verschiedene Lichtbedingungen hervorgerufen werden (Lock 1993). Die Struktur sowie die Entwicklung der Biofilme werden von der Fließgeschwindigkeit stark beeinflusst (Luttenton et al. 1986; Lamb & Lowe 1987). In stark strömenden Bereichen bildet sich nur eine planare Biofilmstruktur heraus, während in schwach strömenden Bereichen sich eine komplexe dreidimensionale Struktur entwickelt (Luttenton et al. 1986, Lock 1993).

1.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) und Bildanalyse

Die detaillierte Erforschung von Biofilmen und ihrer sehr komplexen Struktur wurde erst durch die Einführung von konfokalen Laser Scanning Mikroskopen ermöglicht. Mitte der achtziger Jahre waren die ersten CLSM-Mikroskope erhältlich. Danach kamen sie vor allem im medizinischen Bereich zum Einsatz. Erst seit Beginn 1990 wurde die CLSM für die Erforschung von Biofilmsystemen genutzt. Mit einer der ersten Arbeiten auf diesem Gebiet zeigten Lawrence et al. (1991) das Potential der CLSM für die Biofilmforschung. Die annähernd gleichzeitige Entwicklung einer Reihe von Fluoreszenzmarkern eröffneten eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten (Neu & Lawrence 2002).

Von einer Vielzahl von Mikroskopietechniken eignet sich die konfokale Laser Scanning Mikroskopie am besten für die Untersuchung von Biofilmsystemen (Surman et al. 1996). Aus diesem Grund wird die CLSM in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen vor allem zur Aufklärung der Biofilmstruktur und der Biofilmzusammensetzung eingesetzt (Neu & Lawrence 1997). Sie bietet gegenüber den konventionellen Mikroskopen entscheidende Vorteile (Lawrence et al. 1998a, Lawrence & Neu 1999, Sheppard & Shotton 1997, Pawley 1995). Die CLSM ermöglicht ein optisches Schneiden des Probenmaterials, so dass ein aufwendiges Präparieren und Fixieren der Proben, welches die natürliche komplexe Biofilmstruktur beeinträchtigt und mitunter zerstört, entfällt. Durch eine konfokale Blende wird das Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausgeblendet und trägt somit nicht zur Bildentstehung bei. Diese Technik ermöglicht es, von dicken biologischen Proben ohne Präparation eine dünne Schicht kontrastreich abzubilden. Aber nicht nur eine Ebene des Objektes kann dargestellt werden. Durch die Aufnahme vieler einzelner Schichten kann eine gesamte dreidimensionale Abbildung erfolgen. Die digitalen Bilddaten erlauben später eine Bildbearbeitung und eine qualitative sowie quantitative Analyse des zu untersuchenden Objektes. Die dreidimensionale Rekonstruktion des Biofilms ermöglicht die Aufklärung seiner räumlichen Struktur.

1.2.1 Funktionsweise des konfokalen Laser Scanning Mikroskop

Die konfokalen Laser Scanning Mikroskope sind in der Regel mit verschiedenen Lasern ausgestattet, welche mehrere Anregungswellenlängen liefern. Der Laserstrahl gelangt über den Farbteiler und Scanner in das Mikroskop-Objektiv. Mit Hilfe des z-Motors wird die Probe unter dem Objektiv so positioniert, dass der Laserstrahl in der angegebenen Ebene genau fokussiert werden kann. Die vertikale Bewegung des Objektes durch den Motortisch ermöglicht Aufnahmen von optischen Schnitten durch das gesamte Objekt. Das z-Intervall bestimmt den Abstand zwischen zwei optischen Schnitten. Später werden die so entstandenen Einzelbilder wieder übereinander gelegt, wodurch das Objekt dreidimensional rekonstruiert werden kann.

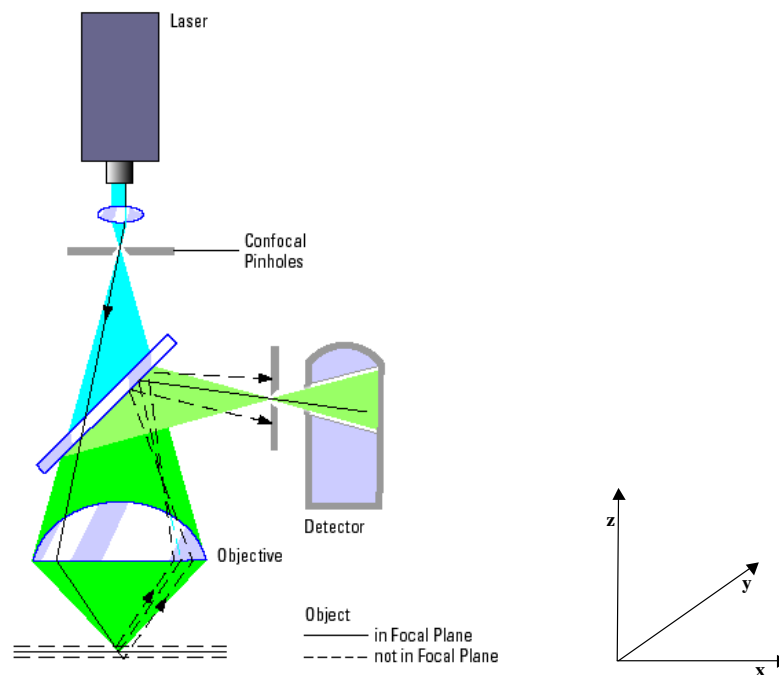


Abb. 1-1 Strahlengang im Leica CLSM (Olschewski 2000)

Der Scanner bewegt den fokussierten Laserstrahl und tastet das Objekt punktwise ab. Die Emissionsfluoreszenzen der angeregten Fluorochrome werden über das Objektiv gesammelt und über den Farbsplitter zum Photomultiplier weitergeleitet. Der Farbsplitter besteht aus Hauptfarbsplitter, Nebenfarsplitter und Emissionsfilter. Durch ihn kann die zur Anregung benutzte Laserlinie von der Emissionsfluoreszenz getrennt werden. Außerdem dient er zur spektralen Aufspaltung verschiedener Fluoreszenzemissionen wodurch verschiedene Wellenlängenbereiche zu einem jeweiligen Kanal zugeordnet und so getrennt dargestellt werden können. Die Anzahl der wählbaren Kanäle ist durch die zur Verfügung stehende Anzahl an Photomultipliern begrenzt. Dies bestimmt somit die Anzahl der gleichzeitig einsetzbaren Fluorochrome. Bevor das emittierte Fluoreszenzlicht in die Photomultiplier geleitet wird, passiert es eine konfokale Blende. Sie ist in einer zum Fokus konjugierten Ebene angeordnet, so dass das Licht aus Ebenen über und unter der Fokusebene ausgeblendet wird und nicht zur Bildentstehung beiträgt. Der Durchmesser der konfokalen Blende legt fest, in welchem Umfang Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird, daher besitzt er eine entscheidende Bedeutung für die Auflösung und die Tiefendiskriminierung. Im dahinter liegenden Photomultiplier werden die emittierten / reflektierten Photonen pixelweise detektiert. Es kommt zu einer Umwandlung von optischen zu elektronischen Informationen. Die Informationen der einzelnen Objektpunkte führen zu einer zeitlichen Intensitätsschwankung. Durch die Scangeschwindigkeit ist die Orts- und Zeitkoordinate miteinander verknüpft. Ein Analog/Digital - Wandler ermöglicht die Umwandlung dieser Signale in die einzelnen Pixelintensitäten. Dafür transformiert er durch periodisches Abtasten das kontinuierliche elektrische Signal in eine Folge von Messwerten.

1.2.2 Bildanalyse

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie bietet durch die Erzeugung von digitalen Bilddaten die Möglichkeit einer Bildanalyse und quantitativen Auswertung der Bilddaten mit dem Computer. Neben mikroskopischen Untersuchungen erhält man somit erstmals die

Gelegenheit einer speziellen Objektanalyse, um quantitative Aussagen über die untersuchten Biofilme zu erhalten. Detaillierte Untersuchungen zur quantitativen Verteilung von Bakterien, Algen und EPS im mikrobiellen Biofilm waren durch die Kombination von CLSM und digitaler Bildanalyse möglich (Lawrence et al. 1998b, Paje et al. 2002).

Die Untersuchung und Charakterisierung der Biofilmstruktur ist für die Beschreibung und das Verständnis von Biofilmen sehr wichtig. Hierfür müssen jedoch speziell entwickelte Softwareprogramme verwendet werden. Strukturparameter wie Dichte, Porosität, spezifische Oberfläche und mittlerer Porenradius des Biofilms konnten mit solchen Bildanalyseprogrammen selbst aus Bildern der Lichtmikroskopie bestimmt werden (Zhang & Bishop 1994). Zur Beschreibung der Biofilmstruktur eignet sich ebenfalls eine Analyse zur Variabilität der Biofilmdicke (Stewart et al. 1993) mit Parametern wie der mittleren Biofilmdicke und des Rauigkeitskoeffizienten (Murga et al. 1995) oder der fraktalen Dimension (Hermanowicz et al. 1995). Für eine zweidimensionale Bildanalyse der Biofilmstruktur wurden von Lewandowski et al. (1999) Strukturparameter (Strukturentropie) und Flächenparameter (Flächenporosität, fraktale Dimension, maximale Diffusionsdistanz) verwendet. Die Strukturparameter wurden für die Bestimmung der Heterogenität des Biofilms eingesetzt, während die Flächenparameter zur Beschreibung der morphologischen Struktur des Biofilms dienten.

Die Auswahl möglicher Parameter zur strukturellen Beschreibung der Biofilme ist mittlerweile sehr groß. Je nach Fragestellungen müssen aussagekräftige Merkmale zur Biofilmstruktur gefunden werden. Durch die großen Unterschiede in den zu untersuchenden Biofilmen und in den Datenformaten ist es somit nicht verwunderlich, dass sich verschiedene Arbeitsgruppen eigene Bildanalyseprogramme schreiben (Yang et al. 2000, Jackson et al. 2001, Heydorn et al. 2000a, Xavier et al. 2001). Diese sind speziell für die Probleme und Aufgabenstellungen zugeschnitten. Die einzelnen Programme unterscheiden sich jedoch nicht nur in der Auswahl der zu berechnenden Parameter, sondern oft auch im Segmentierungsalgorithmus.

Bei der quantitativen Bildanalyse ist die Segmentierungsprozedur der entscheidende und zugleich kritische Schritt. Durch diesen Bearbeitungsschritt wird das Grauwert-Bild in ein Binärbild umgewandelt. Das Programm kann dadurch zwischen Objektinformationen und Hintergrund unterscheiden. Am häufigsten genutzt wird die Thresholdsegmentierung durch den Benutzer, wobei der Schwellenwert (Threshold) visuell bestimmt wird und meist für alle untersuchten Bildstapel konstant bleibt (Heydorn et al. 2000a, Yang et al. 2000, Hermanowicz et al. 1995). Bei der einfachsten Thresholdsegmentierungsmethode werden alle Pixel mit einer Intensität über einen gesetzten Schwellenwert als Objektinformation betrachtet, alle Pixel mit einer Intensität unterhalb des Schwellenwertes zählen zum Hintergrund. Wenige Bildanalyseprogramme arbeiten mit einer automatischen Methode zur Bestimmung des Schwellenwertes (Xavier et al. 2001). Dies hat jedoch den Vorteil der Möglichkeit zur völligen Automatisierung der Bildanalyse. Außerdem wird eine subjektive Bestimmung des Schwellenwertes durch den Bearbeiter vermieden, die zu starken Abweichungen zwischen verschiedenen Bearbeitern führen kann. Eine Studie zeigte jedoch, dass ebenfalls starke Abweichungen zwischen verschiedenen automatischen Methoden in der Bestimmung des Schwellenwertes auftreten können und einige sogar zu schlechten Ergebnissen führen können (Yang et al. 2001). Die Einsetzbarkeit von den jeweiligen Methoden ist sehr stark vom Untersuchungsobjekt abhängig. Durch die große Heterogenität von Biofilmproben scheinen sich die meisten automatischen Bestimmungsmethoden weniger für die Analyse von Biofilm zu eignen. Xavier et al. (2001) entwickelten und verwendeten deshalb eine neue Prozedur zur automatischen Bestimmung des Schwellenwertes, welche vergleichbare Schwellenwerte zur

manuellen Bestimmung lieferte. Dabei wurde eine statistische Analyse von lokalen Grauwerten sowie von Gradienten innerhalb des gesamten Bildstapels durchgeführt.

Die Segmentierung des Bildes führt zur Unterscheidung zwischen Objektinformation und Hintergrund. Erst danach ist die Ermittlung von Strukturparametern sowie Volumenangaben möglich. Diese qualitativen und quantitativen Parameter spielen eine immer größer werdende Rolle bei Biofilmuntersuchungen und führen zu einem besseren Verständnis der Entwicklung und der Eigenschaften von Biofilmsystemen.

1.3 Mikroelektroden

Mikroelektroden besitzen für die Untersuchung von Biofilmsystemen eine große Bedeutung (Revsbech & Jørgensen 1986, Buffle & Horvai 2000). Physiko-chemische Parameter können innerhalb der Biofilmstruktur starke Schwankungen aufweisen. Vor allem in dickeren Biofilmen bilden sich starke Konzentrationsgradienten heraus. Für Untersuchungen von Stoffumsatz- sowie Stofftransportprozessen werden somit Sensoren mit einer sehr kleinen räumlichen Auflösung benötigt.

Mikroelektroden werden seit rund 20 Jahren von Mikrobiologen eingesetzt. In den ersten Arbeiten kamen Sauerstoffmikroelektroden zur Untersuchung von Sauerstoffkonzentrationsgradienten, z.B. im „Schleim“ oder in Mikrokolonien (Chen & Bungay 1981), zum Einsatz. Der Einfluss von Strömungs- und Substratbedingungen auf die Sauerstoffprofile in Biofilmen von Festbettreaktoren wurde von Kuenen et al. 1986 untersucht. Neben den amperometrischen Sauerstoffmikroelektroden wurden ionenselektive Mikroelektroden zur Bestimmung von Chlorid, Natrium, Kalium, Calcium, Ammonium und Nitrat (Armstrong & Garcia-Dias 1980, Baumgarten 1981) sowie Enzymelektroden z.B. für Glukose (Cronenberg & Van den Heuvel 1991) entwickelt. Die Entwicklung einer verbesserten Sauerstoffmikroelektrode (Revsbech 1989) erlaubte die Messung von Sauerstoffkonzentrationen mit einer räumlichen Auflösung von wenigen Mikrometern und einer schnellen Ansprechzeit. Sie ermöglichte photosynthetische und respiratorische Untersuchungen der benthischen Lebensgemeinschaft (Glud et al. 1992). Mittlerweile gibt es eine breite Palette von Mikroelektroden mit denen die unterschiedlichsten Biofilmprozesse untersucht und aufgeklärt werden können.

Revsbech & Jørgensen 1981 entwickelten eine neue Methode „light-dark shift method“ zur Bestimmung der benthischen Photosynthese mit Hilfe von Sauerstoffmikroelektroden. Voraussetzung für diese Methode sind eine konstante Respiration und eine konstante Diffusion während der Licht- und der Dunkelphase. Befindet sich das System in einem stationären Zustand, gleicht die Sauerstoffproduktion den Verlust durch Respiration und Diffusion aus. Nach Abdunkelung stoppt die Sauerstoffproduktion und die Konzentration von Sauerstoff nimmt in den ersten Sekunden mit der gleichen Rate wie die vorher stattfindende Photosynthese ab, vorausgesetzt die Respiration bleibt unverändert und die Diffusion ist vernachlässigbar. Glud et al. 1992 zeigten, dass die Respiration innerhalb des Biofilms während der ersten 4,6 Sekunden nach der Abdunkelung konstant bleibt. Somit kann unabhängig von der Respiration die photosynthetische Aktivität indirekt über den Sauerstoffkonzentrationsabfall nach der Abdunkelung eines Biofilmsystems gemessen werden.

1.4 Biofilmmodellierung

Mathematische Modelle werden schon seit fast 30 Jahren genutzt um den Stoffumsatz und den Stofftransport in mikrobiellen Lebensgemeinschaften zu simulieren. Die anfängliche Vorstellung von planaren Biofilmen mit relativ konstanten Dicken spiegelte sich auch in den ersten mathematischen Modellen zur Beschreibung von Biofilmen wider. Es wurde von einer homogenen gleichmäßigen Struktur und einer räumlich und zeitlich konstanten Biofilmmzusammensetzung ausgegangen (La Motta 1976, Williamsen & McCarty 1976, Chen et al. 1989, Rittmann & Manem 1992).

Später entwickelten Wanner und Gujer ein dynamisches Modell, welches den Biofilm in verschiedene Kompartimente unterteilt: Aufwuchsfläche, Biofilm, Konzentrationsgrenzschicht, Wasserschicht (Gujer & Wanner 1990). Das Wachstum von Bakterien sowie die Konkurrenz verschiedener Bakterienspezies um Raum und Substrat sind in diesem Modell integriert. Ebenfalls wurden verschiedene Prozesse in den Kompartimenten, wie z.B. Transport und Umwandlung von gelösten Stoffen im Biofilmsystem berücksichtigt. Aber auch dieses Modell konnte noch nicht die komplexe heterogene Biofilmstruktur darstellen. Durch detaillierte Untersuchungen von Biofilmen und von einzelnen Biofilmbestandteilen in Folge neuer Methoden und Techniken konnten die Biofilmmodelle weiterentwickelt und neue Biofilmprozesse eingebaut werden. Die Umwandlung von Biomasse durch Inaktivierung, Hydrolyse und Wachstum von Mikroorganismen in auto- und heterotrophen Biofilmen wurde mit Hilfe von Mikroelektroden untersucht und von Horn und Hempel (1997a, b) in ein Biofilmmodell basierend auf dem Modell von Wanner und Gujer integriert. Untersuchungen von Stofftransport- und Stoffumwandlungsprozessen (Picioreanu et al. 2000a, Horn & Hempel 1998, Hermanowicz 1999, Buffiere et al. 1998), zum Einfluss der Hydrodynamik (Picioreanu et al. 1999) sowie der Populationsdynamik (Noguera et al. 1999b) flossen in die immer komplexer werdenden Modelle ein. Eine dreidimensionale Beschreibung der heterogenen Biofilmstruktur, ihrer Entwicklung und deren Einflussgrößen wurden durch die rasante Entwicklung der Computertechnik möglich.

Der Einfluss und die Funktion der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) im Biofilm wurden in vielen Untersuchungen deutlich (Kreft & Wimpenny 2001, Liu et al. 2001, Wolfaardt et al. 1994, Flemming & Wingender 2001, Wingender et al. 1999). Aufgrund ihrer großen Bedeutung für die Biofilmstruktur und die Sorptionseigenschaften des Biofilms wurden die EPS in den neuesten Biofilmmodellen als Volumenfraktion in die Modelle aufgenommen und ihr Einfluss berücksichtigt (Horn et al. 2001, Kreft & Wimpenny 2001).

Diese mathematischen Modelle dienen vor allem zum besseren Verständnis der Biofilmentwicklung, Struktur und Zusammensetzung. Durch Variierung einzelner Modellparameter ist es möglich ihren Einfluss auf die Biofilmeigenschaften, wie z.B. die Umsatzleistung, die Sorptionskapazität, die Biofilmdichte und die Biofilmdicke, von Reaktorbiofilmen abzuschätzen.

Neben einer Vielzahl von Modellen welche Transport- und Stoffumwandlungsprozesse in Reaktorbiofilmen simulieren (Hao et al. 2002, Horn & Hempel 1998, Picioreanu et al. 2000a, b, Eberl et al. 2000, Hermanowicz 1999, Noguera et al. 1999b, Arcangeli & Arvin 1999), gibt es nur sehr wenige die sich auf den benthischen Biofilm beziehen. Selbst bei Simulationen der Stoffumwandlungsprozesse in Fließgewässern wird der benthische Biofilm nur in wenigen Arbeiten berücksichtigt (Horn & Wulkow 1996, Reichert 2001). Für eine umfangreiche Beschreibung der Prozesse in Fließgewässern wurde das „River Water Quality Model No.1“ entwickelt (Shanahan et al. 2001, Reichert et al. 2001, Vanrolleghem et al. 2001). Dafür

wurden eine Vielzahl von Gleichungen zur Beschreibung von biochemischen Prozessen in Fließgewässern zusammengetragen (Reichert et al. 2001). Auch werden Empfehlungen für die Anwendung der einzelnen Modellformulierungen und zum Entscheidungsprozess, welche von ihnen wann eingesetzt werden sollten, gegeben (Vanrolleghem et al. 2001). Die Prozesse im benthischen Biofilm wurden in diesem Modell mit formuliert. Da jedoch keinerlei experimentelle Daten vorlagen, ist es ein rein theoretischer Ansatz. Eine Simulation der Entwicklung des benthischen Biofilms von Fließgewässern im Verlauf des Jahres wurde noch nie durchgeführt.

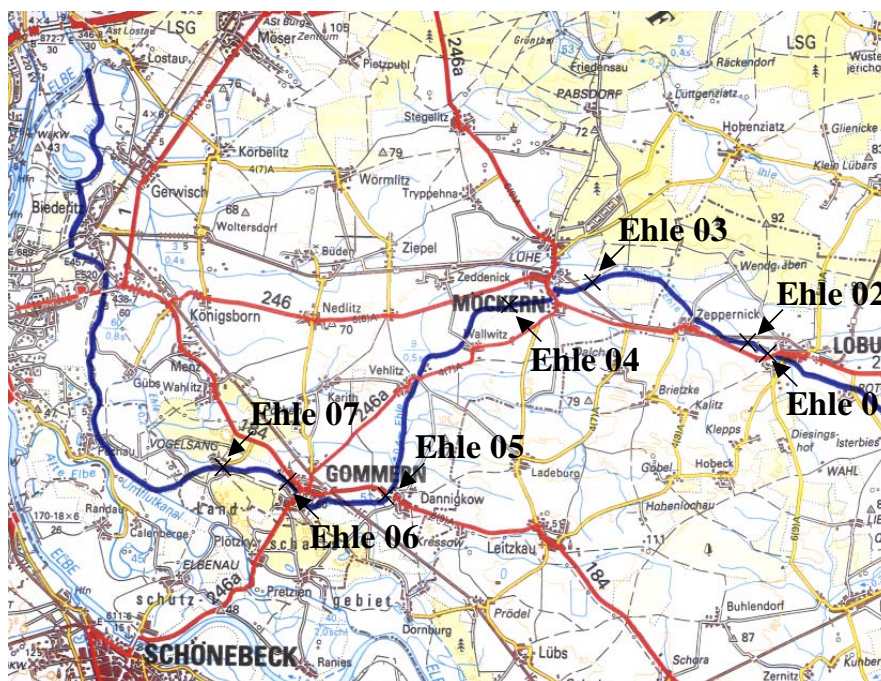
1.5 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Struktur und Entwicklung des benthischen Biofilms zu erhalten. Mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie soll die benthische Biofilmentwicklung über einen langen Zeitraum verfolgt werden, um eine saisonal bedingte Änderungen der Struktur zu erfassen. Dafür ist es erforderlich einen Aufwuchsträger zu entwickeln, um eine bessere und umfangreichere Untersuchung von Fließgewässerbiofilmen zu ermöglichen. Auf ihm sollen sich repräsentative, mit denen auf natürlichen Substraten vergleichbare Biofilme entwickeln. Die drei-dimensionalen digitalen Datensätze des konfokalen Laser Scanning Mikroskop sollen qualitativ sowie quantitativ ausgewertet werden, um die Zusammensetzung des benthischen Biofilm zu erforschen. Dafür ist es notwendig verschiedene Quantifizierungsprogramme auf ihre Eignung für die Analyse von Fließgewässerbiofilmen zu untersuchen. Weiterhin sollen Sauerstoffmikroelektroden eingesetzt werden, um Sauerstoffkonzentrationsprofile und die photosynthetische Sauerstoffproduktion in benthischen Biofilmen zu ermitteln. Außerdem werden Untersuchungen zum Einfluss der Fließgeschwindigkeit, der Aufwuchsoberfläche und der Ammoniumkonzentration auf die Biofilmzusammensetzung und die Biofilmstruktur durchgeführt. Hierfür sollen unter anderem auch Biofilmreaktoren eingesetzt werden. Mit Hilfe der gewonnen Ergebnisse soll das Wachstum des benthischen Biofilms in kleinen Fließgewässern sowie die Änderung der Biofilmdicke während des Jahres in einem Biofilmmodell simuliert werden. Darüber hinaus sollen in einem zweiten Biofilmmodell die quantitativen Ergebnisse der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie mit den gewonnenen Daten aus den Mikroelektrodenuntersuchungen in einer Simulation verknüpfen werden.

2 Material /Methoden

2.1 Untersuchungsgebiet

Die Untersuchungen wurden an der Ehle, einem kleinen Fließgewässer in Sachsen-Anhalt, durchgeführt. Die Ehle entspringt im Bereich des Fläming bei Schweinitz und durchfließt vorwiegend landwirtschaftlich genutzte Gebiete bevor sie in der Nähe von Magdeburg in die Elbe mündet (**Abb. 2-1**). Dabei legt sie eine Strecke von 60,2 Kilometern zurück. Das Einzugsgebiet der Ehle umfasst die westlichen Ausläufer des Fläming und hat insgesamt eine Fläche von 281 km². Starke landwirtschaftliche Emissionen, wasserbauliche Regulierungsmaßnahmen und Abwassereinleitungen von Kläranlagen führen zu einer starken Belastung der Ehle. Charakteristisch ist ein sandig-schlammiges Sediment und ausgeprägte Makrophytenbestände. Vom staatlichen Amt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt wurde die Ehle in regelmäßigen Abständen untersucht und in die Güteklasse II-III eingestuft (Staatliches Amt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt 1997).



Entfernung der
Probenahmestellen
von der Quelle in km

Ehle 01	12,63
Ehle 02	13,38
Ehle 03	20,27
Ehle 04	23,45
Ehle 05	32,42
Ehle 06	37,42
Ehle 07	39,04

Abb. 2-1 Verlauf des Fließgewässers Ehle und Positionen der Probenahmestellen

Vor Beginn der Experimente wurden an verschiedenen Standorten der Ehle Wasserproben entnommen, um einen Gesamteindruck des Fließgewässers sowie eine Auswahl geeigneter Probenahmestellen zu erhalten. Die erste Probenahmestelle (Ehle 01) liegt am Ortsausgang der Kleinstadt Loburg. Insgesamt wurden 7 Standorte auf einer Flußlänge von ca. 39 km beprobt (**Abb. 2-1**). Die letzte Probenahmestelle (Ehle 07) liegt kurz vor dem Eintritt der Ehle in den Umflutkanal der Elbe 1,5 km unterhalb von Gommern.

Für die weiteren Untersuchungen des benthischen Biofilms wurden die Standorte Ehle 02 und Ehle 04 ausgewählt. Der Standort Ehle 02 befindet sich ca. 1 km unterhalb von Loburg kurz hinter der Einleitung eines kommunalen Klärwerks. Der zweite Standort befindet sich 4,4 km unterhalb von Möckern.

2.1.1 Standortparameter

Um das Fließgewässer an den Untersuchungsstandorte besser charakterisieren zu können, wurden die Fließgeschwindigkeit (Nautilus C2000, OTT-Hydrometrie, Kempten) und die Wassertiefe wöchentlich erfasst. Ebenfalls bestimmt wurden die Temperatur, der pH-Wert, die Sauerstoffkonzentration und die elektrische Leitfähigkeit mit Hilfe einer Multiparametersonde (WTW, Weilheim, Germany).

2.1.2 Wasseranalysen

In den Wasserproben der verschiedenen Standorte wurden die Konzentrationen von Ammonium, Nitrit und Nitrat, der gelöste sowie der gesamte organische Kohlenstoff, das gelöste reaktive Phosphat und der Gesamtphosphat im Labor bestimmt. An den beiden ausgewählten Standorten Ehle 02 und Ehle 04 wurden diese Wasseranalysen wöchentlich während des gesamten Untersuchungszeitraums durchgeführt. Zusätzlich wurden an diesen

Tabelle 2-1 Analysierte Parameter sowie die verwendeten Bestimmungsmethode

Element		Methode	Einheit	Nachweisgrenzen
Alkali-Erdalkali	Ba_gelöst	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 10 µg/l
Alkali-Erdalkali	Ba_gesamt	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 10 µg/l
Alkali-Erdalkali	Ca ²⁺	IC (Ionenchromatogr.)	mg/l	< 20 mg/l
Alkali-Erdalkali	K ⁺	IC (Ionenchromatogr.)	mg/l	< 2 mg/l
Alkali-Erdalkali	Mg ²⁺	IC (Ionenchromatogr.)	mg/l	< 5 mg/l
Alkali-Erdalkali	Na ⁺	IC (Ionenchromatogr.)	mg/l	< 10 mg/l
Anionen	Cl ⁻	IC (Ionenchromatogr.)	mg/l	< 25 mg/l
Anionen	SO ₄ ²⁻	IC (Ionenchromatogr.)	mg/l	< 50 mg/l
Kohlenstoff	DOC	2 verschiedene (IR-Spektrometrie)	mg/l	< 0,5 mg/l
Kohlenstoff	TOC	2 verschiedene (IR-Spektrometrie)	mg/l	< 0,5 mg/l
Nährstoffe	NH ₄ -N	2 verschiedene	mg/l	< 0,01 mg/l
Nährstoffe	NO ₂ -N	2 verschiedene	mg/l	< 0,006 mg/l
Nährstoffe	NO ₃ -N	SFA / Nährstoffe Stdmeth.	mg/l	< 0,045 mg/l
Nährstoffe	SRP	3 verschiedene	mg/l	< 0,003 mg/l
Nährstoffe	TN	SFA / TN / Korolef	mg/l	< 0,09 mg/l
Nährstoffe	TP	Photometrie / TP	mg/l	< 0,006 mg/l
SM	Al_gelöst	ICP-OES (Atomemission)	µg/l	< 100 µg/l
SM	Al_gesamt	ICP-OES (Atomemission)	µg/l	< 100 µg/l
SM	As_gesamt	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 1,0 µg/l
SM	As_gelöst	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 1,0 µg/l
SM	Cd_gelöst	GF-AAS (Atomabsorption)	µg/l	< 0,20 µg/l
SM	Cd_gesamt	GF-AAS (Atomabsorption)	µg/l	< 0,20 µg/l
SM	Co_gelöst	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 0,20 µg/l
SM	Co_gesamt	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 0,20 µg/l
SM	Cu_gelöst	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Cu_gesamt	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Cr_gelöst	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Cr_gesamt	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Fe_gelöst	ICP-OES (Atomemission)	µg/l	< 10 µg/l
SM	Fe_gesamt	ICP-OES (Atomemission)	µg/l	< 10 µg/l
SM	Mn_gelöst	ICP-OES (Atomemission)	µg/l	< 10 µg/l
SM	Mn_gesamt	ICP-OES (Atomemission)	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Ni_gelöst	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Ni_gesamt	ICP-MS (anorg.Massenspektrometrie)	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Pb_gelöst	ICP-MS oder ICP-OES	µg/l	< 2,0 µg/l
SM	Pb_gesamt	ICP-MS oder ICP-OES	µg/l	< 10 µg/l
SM	Zn_gelöst	ICP-MS oder ICP-OES	µg/l	< 10 µg/l
SM	Zn_gesamt	ICP-MS oder ICP-OES	µg/l	< 10 µg/l

beiden Standorten sowie am Standort Ehle 06 im Frühjahr 2000 eine Vielzahl von Elementen analysiert. Alle gemessenen Parameter sowie die dafür benutzten Analysemethoden mit ihren Nachweisgrenzen sind in **Tabelle 2-1** aufgelistet.

2.1.3 Makrozoobenthos

An beiden Probenahmestellen Ehle 02 und Ehle 04 wurden Makrozoobenthosuntersuchungen im Mai 2002 durchgeführt. Pro Standort wurden 8 Proben mit einem Surbersampler (Bodenfläche 40 x 40 cm, Maschenweite 0,5 mm) genommen und im Labor mit Hilfe eines Binokulars bestimmt.

2.1.4 Untersuchungsgebiet am South-Saskatchewan-River

Im Rahmen einer deutsch-kanadischen Kooperation wurden Untersuchungen von Fließgewässerbiofilmen aus dem South-Saskatchewan-River in Saskatoon, Kanada, durchgeführt. Der South-Saskatchewan-River entspringt in Alberta (Kanada) und gehört zum Saskatchewan-Nelson-Flusssystem. Die Nährstoffkonzentrationen des Flusses im Bereich von Saskatoon sind sehr gering. Die Ammoniumkonzentration liegt das gesamte Jahr bei maximal 0,1 mg/l. Auch Nitrat weist während der Sommermonate ähnlich geringe Werte auf. Die gelösten organischen Substanzen liegen im Konzentrationsbereich von 2,6 bis 4,2 mg/l. Das gelöste reaktive Phosphat liegt meist unterhalb der Nachweisgrenze von 0,05 mg P/l.

2.2 Biofilmuntersuchungen

2.2.1 Jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms

Die Entwicklung des benthischen Biofilms eines kleinen Fließgewässers wurde in den Jahren 2000 und 2001 in der Ehle untersucht. Dafür wurden Probenträger (**Abb. 2-2**) an den Standorten Ehle 02 und Ehle 04 ausgebracht. Die Probenträger dienten der Anzucht von benthischen Biofilmen im Fließgewässer und sollten eine sichere und störungsfreie Entnahme des Biofilms gewährleisten. Als Aufwuchsfläche für den Biofilm dienten Polykarbonatprobenträger, welche auf einer Plexiglasplatte befestigt wurden. Ein Betonsockel verhinderte das Driften der Probenträger.



Abb. 2-2 Vorrichtung zur Platzierung von Polykarbonatprobenträgern zum Aufwuchs von Biofilmen in der Ehle

Für die Untersuchungen der Biofilmentwicklung wurden 2 Versuchsreihen durchgeführt. Um den Einfluss der Jahreszeiten auf die Anfangsentwicklung zu erfassen, wurde die 1. Versuchsreihe im Frühjahr (am 05.04.00) und die 2. Versuchsreihe im Herbst (am 19.09.00) gestartet. Um die Entwicklung der Biofilme verfolgen zu können, wurden kontinuierlich Biofilmprouben entnommen und unmittelbar danach mit dem CLSM mikroskopiert. Die genauen Daten der einzelnen Probenahmen sind in **Tabelle 2-2** aufgelistet. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit von Biofilmen gewachsen auf Polykarbonatprobenträgern und auf natürlichen Substrata wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten Steine von beiden Standorten untersucht.

Tabelle 2-2 Datum und Alter der Biofilme der einzelnen Probenahmen von Probenträgern aus der Ehle

1. Versuchsreihe (Ehle)		2. Versuchsreihe (Ehle)	
Biofilmentnahme	Alter der Biofilme	Biofilmentnahme	Alter der Biofilme
07.04.00	2 Tage	27.09.00	1 Woche
10.04.00	5 Tage	04.10.00	2 Wochen
14.04.00	9 Tage	17.10.00	4 Wochen
19.04.00	2 Wochen	07.11.00	7 Wochen
03.05.00	4 Wochen	27.11.00	10 Wochen
19.05.00	6 Wochen	19.12.00	13 Wochen
15.06.00	9 Wochen	09.01.01	16 Wochen
28.06.00	12 Wochen	07.02.01	20 Wochen
09.08.00	18 Wochen	06.03.01	24 Wochen
14.11.00	7 1/2 Monate	05.04.01	28 Wochen
17.01.01	9 1/2 Monate	21.05.01	35 Wochen

2.2.2 Einfluss der Hydrodynamik und der Nährstoffbedingungen auf die Biofilmstruktur und Biofilmentwicklung

2.2.2.1 Biofilmuntersuchungen in Rotating Annular Reaktoren (RAR)

Um verschiedene Einflüsse auf die Biofilmentwicklung und die Biofilmzusammensetzung untersuchen zu können, wurden im Labor Biofilme unter definierten Bedingungen angezogen. Dafür wurden Rotating Annular Reaktoren (Sinis, Dettingen, Deutschland) benutzt. Sie gewährleisten eine homogene Durchmischung und verschiedene hydrodynamische Belastungen. Diese können über die Rotationsgeschwindigkeit des Innenzylinders verändert werden. Die Reaktoren wurden mit Wasser aus der Ehle im Semi-Batch-Verfahren betrieben, um vergleichbare Nährstoffbedingungen zu erreichen. Auch wurde damit sichergestellt, dass die vorhandenen Mikroorganismen mit denen im Fluss vergleichbar sind. Die Reaktoren wurden mit 12 herausnehmbaren Polykarbonatprobenträgern bestückt, um die Entwicklung des Biofilms im Reaktor verfolgen zu können.

Der Aufbau eines Rotating Annular Reaktors ist in **Abb. 2-3** dargestellt, er besteht aus einem Außenzylinder und einem rotierenden Innenzylinder. Die 12 Polykarbonatprobenträger befinden sich an der Innenseite des Außenzylinders und sind durch Öffnungen einzeln herausnehmbar. Rezirkulationsröhren im Innenzylinder gewährleisten eine optimale Durchmischung des Wasservolumens und verhindern die Ausbildung von Nährstoffkonzentrationsgradienten im Reaktor. Die Reaktorkenngrößen sind in **Tabelle 2-3** zusammengefasst.

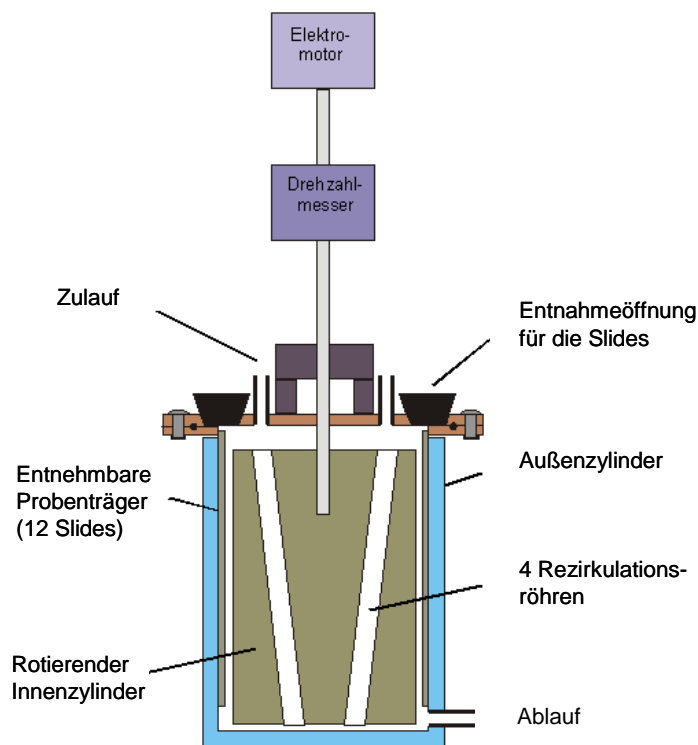


Abb. 2-3 Aufbau eines Rotating Annular Reaktors

Tabelle 2-3 Kenngrößen der verwendeten Rotating Annular Reaktoren

Kenngrößen	Maße
Lichte Weite Außenzylinder	11 cm
Höhe Außenzylinder	20,5 cm
Durchmesser Innenzylinder	9,5 cm
Höhe Innenzylinder	18 cm
Durchmesser Bohrungen Innenzylinder	1 cm,
Gesamtoberfläche im Reaktor	1708 cm ²
Aufwuchsoberfläche eines Proben-trägers	30,8 cm ²
Reaktorvolumen	800 ml

2.2.2.1.1 RAR-Experiment 1: Biofilmentwicklung im Rotating Annular Reaktor und Einfluss der Hydrodynamik auf die Biofilmstruktur

Das erste RAR-Experiment startete gleichzeitig mit dem Ausbringen der Biofilmaufwuchsträger am 05.04.00. Die Reaktoren wurden mit Wasser aus der Ehle gefüttert, um vergleichbare Nährstoffbedingungen und Organismengemeinschaften wie im Fließgewässer zu erhalten. Die Entwicklung der Biofilme in beiden Systemen sollte mit Hilfe der CLSM miteinander verglichen werden.

Weiterhin sollte der Einfluss der hydrodynamischen Bedingungen auf die Biofilmstruktur untersucht werden. In einem Reaktor wurde dafür eine Rotationsgeschwindigkeit von 65 rpm und in dem anderen Reaktor eine Rotationsgeschwindigkeit von 130 rpm eingestellt. Die genauen Probenahmedaten sind in **Tabelle 2-4** zu sehen.

2.2.2.1.2 RAR-Experiment 2: Einfluss von Ammonium auf die Biofilmentwicklung und die Biofilmstruktur

Im zweiten RAR-Experiment wurde der Einfluss von Ammonium auf die Biofilmzusammensetzung untersucht. Das Experiment startete am 19.09.00 und lief über 24 Wochen (**Tabelle 2-4**). Beide Reaktoren liefen mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 130 rpm. Ein Rotating Annular Reaktor wurde ausschließlich mit Ehle-Wasser betrieben. Dem zweiten Reaktor wurde zum Ehle-Wasser ca. 4 mg Ammonium pro Liter und Tag zu dotiert. Dies entspricht ca. 0,033 g Ammonium pro m² und Tag.

Tabelle 2-4 Probenahmedaten zu den RAR-Experimenten

1. Experiment (RAR)		2. Experiment (RAR)	
Biofilmentnahme	Alter der Biofilme	Biofilmentnahme	Alter der Biofilme
07.04.00	2 Tage	26.09.00	1 Woche
10.04.00	5 Tage	04.10.00	2 Wochen
14.04.00	9 Tage	18.10.00	4 Wochen
19.04.00	2 Wochen	06.11.00	7 Wochen
03.05.00	4 Wochen	29.11.00	10 Wochen
18.05.00	6 Wochen	20.12.00	13 Wochen
08.06.00	8 Wochen	08.01.01	16 Wochen
30.06.00	12 Wochen	05.02.01	20 Wochen
10.08.00	18 Wochen	05.03.01	24 Wochen

2.2.2.2 Biofilmproben aus dem South-Saskatchewan-River, Kanada

Bei den kanadischen Untersuchungen sollten zwei Aspekte verfolgt werden. Zum einen sollte der Einfluss des Substrats auf die Biofilmzusammensetzung, den Sauerstoffhaushalt sowie der Photosynthese erforscht werden. Dazu wurden Muscheln und Holz aus dem Fluss gesammelt und anschließend mittels CLSM und Sauerstoffmikroelektroden untersucht. Andererseits sollte der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Biofilmstruktur und den Stoffwechsel ermittelt werden, wozu der Biofilm auf Muscheln und Holz aus der Flussmitte bei hoher Fließgeschwindigkeit sowie vom Flussrand mit einer niedrigen Fließgeschwindigkeit untersucht wurde.

2.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie und Bildanalyse

Um die Biofilmzusammensetzung sowie die drei-dimensionale Struktur der Biofilme untersuchen zu können, wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop des Typs Leica TCS SP mit der Software TCS NT Version 1.6.587 verwendet. Das Mikroskop war mit 3 Lasern ausgestattet, die verschiedene Anregungswellenlängen liefern. Zum Einsatz kamen ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm, ein Krypton-Laser mit einer Laserlinie bei 568 nm und der Helium-Neon-Laser mit einer Laserlinie bei 633 nm. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden wassereintauchbare Leica-Objektive mit einer Vergrößerung von 20 x 0,5 NA für Übersichtsaufnahmen sowie mit einer Vergrößerung von 63 x 0,9 NA für Detailaufnahmen eingesetzt.

2.3.1 Probenvorbereitung und Färbung

Für die Untersuchung der Biofilmstruktur und der Biofilmzusammensetzung wurden der Farbstoff SYTO 9 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) und ein Lektin von *Phaseolus vulgaris* (Sigma, Deutschland) verwendet. SYTO 9 ist ein Nukleinsäurefarbstoff, welcher zur Markierung von Bakterien verwendet wird. Das verwendete Lektin wird aus der Pflanze *Phaseolus vulgaris* hergestellt. Es wurde eingesetzt, um Glykokonjugate (eine Fraktion der extrazellulären polymeren Substanzen) im Biofilm zu markieren.

Die Biofilmproben wurden direkt nach der Entnahme für die CLSM-Untersuchungen vorbereitet. Als erstes wurden die Proben in einer Petrischale befestigt und mit dem Lektin vollständig bedeckt. Dafür wurde 1mg Lektin in 1ml Wasser aufgelöst und 1:10 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Probe mehrfach mit Leitungswasser gespült. Weiterhin wurde die Biofilmprobe mit dem Nukleinsäurefarbstoff SYTO 9 in einer Verdünnung von 1:1000 überschichtet und weitere 5 min inkubiert. Danach wurden die Proben mit Wasser überschichtet und konnten sofort mikroskopiert werden. Da der Biofilm im hydratisierten Zustand und ohne aufwendige Präparation mikroskopiert werden konnte, blieb die natürliche Biofilmstruktur weitestgehend erhalten.

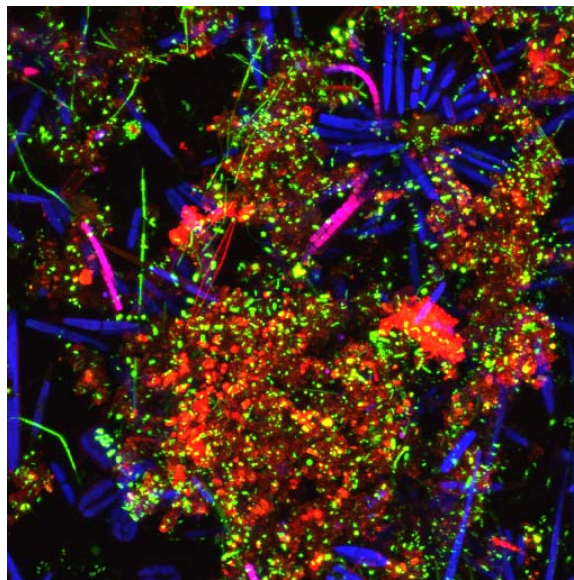
Von einigen Biofilmproben sollten xz-Schnitte hergestellt werden, um die Verteilung der Biofilmkomponenten über die Tiefe besser untersuchen zu können. Dafür wurde das Kryotom Leica CM 3050 S (Leica, Deutschland) verwendet. Sehr dicke Biofilmproben vom Dezember 2000 bis Mai 2001 wurden dafür in das Einbettungsmedium „Tissue freezing medium“ (Leica, Deutschland) eingebettet, sofort bei -20°C eingefroren und im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Im Kryotom wurden die Biofilmproben bei -25 °C in 50 bis 100 µm dicken Schnitten geschnitten. Diese Proben wurden wie oben beschrieben mit SYTO 9 gefärbt und sofort mikroskopiert.

2.3.2 Detektion der Fluoreszenzsignale

Der Nukleinsäurefarbstoff SYTO 9 wurde mit dem Argon-Laser bei 488 nm angeregt. Das emittierte Fluoreszenzsignal wurde im Wellenlängenbereich von 500 bis 550 nm detektiert und im 1. Kanal dargestellt. Die Anregung des TRITC-markierten Lektins erfolgte bei 568 nm mit dem Krypton-Laser. Das Emissionssignal wurde im Bereich von 580 bis 625 nm detektiert und im 2. Kanal aufgezeichnet. Gleichzeitig erhielt man bei Anwesenheit von Cyanobakterien ein Autofluoreszenzsignal in diesem Kanal. Die Autofluoreszenz von Chlorophyll a der Algen und Cyanobakterien wurde mit der 633 nm Laserlinie des Helium/Neon-Laser angeregt, bei 650 bis 800 nm detektiert und im 3. Kanal dargestellt. Die Autofluoreszenz der Cyanobakterien wurde dadurch gleichzeitig im 2. und 3. Kanal detektiert. In der Maximum Intensität Projektion der 3-Kanal CLSM-Bilder (**Abb. 2-4**) werden die Bakteriensignale des 1. Kanals grün dargestellt, der 2. Kanal mit den markierten Glykokonjugaten rot und die im 3. Kanal detektierte Autofluoreszenz blau. Die Cyanobakterien sind auf Grund ihrer Signale im 2. sowie im 3. Kanal in den CLSM-Bildern pink zu erkennen und so von den Algen und den Glykokonjugaten zu unterscheiden. Die Anregungs- und die Emissionswellenlängen der Fluorochrome bzw. Pigmente sowie die Zuordnung der Fluoreszenzbereiche zu einem Kanal und einer Farbe für die Darstellung sind in **Tabelle 2-5** zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2-5 Anregung und Emission der Farbstoffe/Fluorochrome bzw. Pigmente und Zuordnung der Fluoreszenzbereiche zu den Detektionskanälen und Farbe

	Anregung	Emission	Kanal	Objekt/Struktur	Farbzuordnung
SYTO 9	488 nm (Ar Laser)	500 – 550 nm	1	Bakterien	grün
TRITC-Lektin (<i>Phaseolus vulg.</i>)	568 nm (Kr Laser)	580 – 625 nm	2	Glykokonjugate	rot
Phycoerythrin Phycocyanin	568 nm (Kr Laser)	580 – 625 nm	2	Cyanobakterien	rot
Chlorophyll a	633 nm (HeNe Laser)	650 – 800 nm	3	Algen Cyanobakterien	blau

**Abb. 2-4** Darstellung einer Maximum Intensität Projektion eines RAR-Biofilms. Als Färbemethoden wurden verwendet: eine Nukleinsäuremarkierung SYTO 9 zur Visualisierung der Bakterien (grün) und ein TRITC-Lektin (*Phaseolus vulgaris*) zur Anfärbung von Lektin-spezifischen Glykokonjugaten (rot). Ebenfalls detektiert wurde die Autofluoreszenz der Algen (blau) sowie der Cyanobakterien (pink).

2.3.3 Mikroskopeinstellungen

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde eine Übersichtsaufnahme mit dem wassereintauchbaren 20 x 0,5 NA Leica-Objektiv erstellt. Von jeder Biofilmprobe wurden 5 Detailaufnahmen mit dem wassereintauchbaren 63 x 0,9 NA Leica-Objektiv für die Bildanalyse aufgenommen. Die benutzten Mikroskopeinstellungen sind in **Tabelle 2-6** aufgelistet.

Tabelle 2-6 Einstellungen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop

Laserleistung	50 %
Scanmodus	xy
Scangeschwindigkeit	medium
Pixelauflösung	512 x 512
Schnittdicke	1 µm oder 5 µm
Averagemethode	2
konfokale Blende	1 Airy disk
Zoom	1

2.3.4 Bildanalyse

2.3.4.1 Vergleich von Bildanalyseprogrammen

Für die Auswertung der Bilddaten standen 4 Bildanalyseprogramme zur Verfügung: Scion Image, Voxelshop Pro, Comstat und Microstat. Alle Programme wurden auf ihre Eignung zur Bearbeitung unserer Bilddaten getestet und miteinander verglichen. Einige Programme mussten dafür an unsere Dateiformate angepasst werden, z.B. durch das Schreiben neuer Makros bzw. Lesekopfdateien.

Scion Image für Windows ist die PC Version des ursprünglichen Programms NIH Image. Dieses wurde von der Research Services Branch (RSB) des National Instituts of Health (NIH) entwickelt. Das Programm Scion Image ist frei im Internet von der Scion Corporation (www.scioncorp.com) verfügbar. Außerdem findet man dort eine Vielzahl von Makros für die unterschiedlichsten Anwendungen.

Das zweite Programm ist Voxelshop Pro. Es ist Teil eines umfangreichen Softwarepakets der Firma Bitplane aus Zürich, Schweiz. Voxelshop Pro dient der Analyse und Quantifizierung von drei-dimensionalen Bildstapeln. In Kombination mit dem Programm Colocalisation ist es möglich, doppelt markierte Objekte aus zwei Bildkanälen zu bestimmen und zu separieren.

Die beiden Programme Comstat und Microstat sind speziell für die Bearbeitung von Biofilm-Datensätzen entwickelt wurden. Comstat wurde geschrieben von Arne Heydorn an der Technischen Universität von Dänemark. Es ist ein Skript für MATLAB 5.3 (The MathWorks Ins., Natick, Massachusetts), benötigt wird zusätzlich noch die Image Processing Toolbox, ein spezielles Programmwerkzeug von MATLAB. Das Programm Comstat wurde geschrieben, um die Struktur von Kultur-Biofilmen zu untersuchen und zu quantifizieren.

Microstat wurde hingegen für die Auswertung von komplexen Biofilmen entwickelt. Dieses Programm wurde von Steven Bergner aus der Arbeitsgruppe Bildverarbeitung/Bildverstehen der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Grenzflächenmikrobiologie des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle geschrieben. MICROSTAT wurde speziell auf die Probleme der CLSM-Bilder aus den vorliegenden Untersuchungen abgestimmt.

Die Bildanalyseprogramme Scion Image, Voxelshop Pro, Comstat sowie Microstat wurden für die Auswertung der aufgenommenen CLSM-Bilder getestet. Die für unsere Anwendung entscheidenden Merkmale sind in **Tabelle 2-7** zusammengefasst. Scion Image ist das einzige Programm das eine zwei-dimensionale Bearbeitung der Bilder vornimmt. In jedem Einzelbild eines Bildstapels wird separat die Anzahl der Pixel bestimmt. Später kann der Bearbeiter mit Hilfe der Kenntnis über die Schnittdicke und der Pixelgröße das detektierte Biovolumen pro Biofilmschicht sowie das Gesamtvolumen der einzelnen Kanäle berechnen. Voxelshop Pro führt dagegen eine drei-dimensionale Berechnung aller gefundenen Bildobjekte durch. Als Ergebnis erhält man Informationen über Intensität und Volumen jedes gefundenen Bildobjektes und kann damit das Gesamtvolumen aller gefundenen Objekte in jedem Kanal berechnen. Eine Verteilung der Objekte über die Biofilmschichten erhält man jedoch nicht. Die Prozedur der Bildanalyse lässt sich bei diesem Programm nicht automatisieren, so dass jeder Bildstapel einzeln bearbeitet werden muss. In Verbindung mit dem Programm Colocalisation kann man das Volumen von Objekten, welche in mehreren Kanälen ein Emissionssignal geben, berechnen. Die Programme Comstat und Microstat wurden speziell für die Auswertung von CLSM-Bildern von Biofilmen entwickelt. Aus diesem Grund wurde neben Berechnungen von Volumenparametern auch die Bestimmung spezieller Strukturparameter für Biofilme in die Programme integriert. Bei beiden Programmen erfolgt eine drei-dimensionale Berechnung und Auswertung. Das Programm Comstat wurde im

Gegensatz zu Microstat nur für die Auswertung von Einkanalbildern entwickelt. Erst nach dem Schreiben einer neuen Einlesedatei und einer Anpassung der Berechnungsfunktionen (durchgeführt von Olaf Büttner, UFZ Leipzig-Halle) wurde es möglich, dass das Programm die einzelnen Kanäle automatisch nacheinander bearbeitet. Während Scion Image, Voxelshop Pro und Comstat eine Thresholdsegmentierung benutzen, verfügt Microstat über einen neu entwickelten Segmentierungsalgorithmus auf der Basis einer Wasserscheidentransformation. Damit errechnet das Programm Volumenparameter, Objektinformationen, Strukturparameter sowie kolokalisierende Objekte (Cyanobakterien).

Tabelle 2-7 Darstellung der wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Bildanalyseprogramme

Programm	Berechnung 2-d	gleichzeitige Bearbeitung 3-d mehrerer Kanäle	Volumen- bestimmung	Möglichkeit zur Automatisierung	gemessene Parameter
Scion Image	x	nein	nein	ja	Pixelanzahl
Voxelshop/ Col		x	ja	nein	Objektvolumen Kolokalisation
Comstat		x	ja	ja	Strukturparameter, Volumenparameter
Microstat		x	ja	ja	Strukturparameter, Volumenparameter Kolokalisation

2.3.4.2 Segmentierungsalgorithmen

Die Programme Scion Image, Voxelshop Pro und Comstat arbeiten mit einer Thresholdsegmentierung. Der erste Schritt beim Segmentierungsalgorithmus ist die Entscheidung, ob ein Pixel zum Hintergrund oder zum Objekt gehört. Dies wird mit Hilfe eines Schwellenwertes (Threshold) entschieden, welcher manuell vom Bearbeiter bestimmt wird. Alle Pixel oberhalb des gesetzten Schwellenwertes gelten als Bildobjekte, während alle Pixel mit einer Intensität unterhalb des Schwellenwertes als Hintergrundrauschen gelten und eine Intensität von 0 erhalten. Die maximale Pixelintensität in einem Bild ist dabei 255.

Für das Programm Microstat wurde ein neuer Algorithmus zur Bildsegmentierung auf der Basis einer Wasserscheidentransformation entwickelt, um eine bessere drei-dimensionale Objekterkennung zu gewährleisten. Die Trennung dicht beieinander liegender Objekte mit diffusen Begrenzungen konnte dadurch wesentlich verbessert werden. Der Segmentierungsalgorithmus beginnt mit der Suche nach Intensitätsmaxima. Diese Maxima dienen als Saatpunkte der Segmente. Der Intensitätsbereich möglicher Maxima wird vorher vom Bearbeiter festgelegt. Von den Intensitätsmaxima aus erfolgt eine Ausdehnung der Segmente in alle drei Richtungen wobei Punkte mit niedrigeren Intensitäten aufgenommen werden. Das Wachstum der Segmente endet bei einem Aufeinandertreffen mit einem anderen Segment oder bei der Unterschreitung eines gesetzten Intensitätswertes. Man kann davon ausgehen, dass mehrere lokale Maxima in einem Objekt auftreten. Nach diesem Schritt erhält man somit eine Übersegmentierung der Objekte. Die Vereinigung dieser Segmente erfolgt durch eine Überprüfung der Intensitätsabnahmen innerhalb der angrenzenden Segmente. Ist das Verhältnis zwischen den Intensitätsmaxima und der Intensität der Randpunkte beider Segmente sehr hoch, handelt es sich sehr wahrscheinlich um zwei verschiedene Objekte. In

diesem Fall kommt es nicht zur Vereinigung. Bei einem geringen Verhältnis handelt es sich um Intensitätsschwankungen innerhalb eines Objektes. Dieses Kriterium entscheidet über eine Vereinigung oder eine Trennung der Segmente. Die Untersuchung der Segmente wird so lange wiederholt bis keine Vereinigung mehr stattfindet.

Fast alle Objekte zeigen eine diffuse Begrenzung. Vor allem überbelichtete Objekte sind oft auf Grund von Streustrahlung wesentlich größer. Um diese etwas zu korrigieren und eine bessere Begrenzung und Darstellung des Objekts zu erhalten, werden Punkte deren Intensität unter einem festgelegten Verhältnis zum Intensitätsmaximum liegen entfernt. Dadurch wird die Streustrahlung bei überbelichteten Objekten beseitigt, während Objekte niedriger Intensität nicht beeinflusst werden.

Im Segmentierungsalgorithmus ist außerdem eine Extrahierung von Objekten, welche in mehreren Detektionskanälen Fluoreszenzsignale geben, eingebaut. Bei vielen Biofilmen wurde die Autofluoreszenz der Cyanobakterien sowohl im 2. Kanal als auch im 3. Kanal detektiert. Gleichzeitig wurde im 2. Kanal das Signal der Glykokonjugate und im 3. Kanal die Autofluoreszenz der Algen aufgenommen. Durch eine Kolo-kalisation des 2. und 3. Kanals werden die Signale der Cyanobakterien am Anfang bestimmt, einem neuen Kanal zugeordnet und so von den Algen und den Glykokonjugaten getrennt analysiert.

2.4 Sauerstoffprofile und photosynthetische Aktivität

Für die Messungen von Sauerstoffprofilen in Biofilmen sowie die Bestimmung der photosynthetischen Aktivität wurden Sauerstoffmikroelektroden vom Clark-Typ (Unisense, Dänemark) eingesetzt. Bei diesen Mikroelektroden (beschrieben von Revsbech 1989) besteht keine räumliche Trennung der Messkathode von der Referenzanode. Kathode und Anode liegen zusammen in einer definierten Elektrolytlösung hinter einer sauerstoffdurchlässigen Silikonmembran. Durch den Einbau einer zusätzlichen Schutzkathode besitzen diese Sauerstoffmikroelektroden eine schnellere Ansprechzeit und ein Signal mit geringer Drift. Dies ist für die Messung photosynthetischer Prozesse unbedingt erforderlich.

In der Konzentrationsgrenzschicht über dem Biofilm kommt es zur Ausbildung eines Sauerstoff-Konzentrationsgradienten. Je nach dem, ob respiratorische oder photosynthetische Prozesse überwiegen, kommt es zu einer Abnahme oder Zunahme der Sauerstoffkonzentration von der Wasserphase zur Biofilmoberfläche. Der Stofftransport von Sauerstoff durch die Konzentrationsgrenzschicht kann unter der Annahme, dass dies ausschließlich durch Diffusion stattfindet, direkt aus den Mikrogradienten berechnet werden und ist ein Maß für die benthische Respiration bzw. Photosynthese.

Der vertikale Stofftransport durch die Konzentrationsgrenzschicht kann mit dem ersten Fick'schen Gesetz beschrieben werden und ist das Produkt aus dem molekularen Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff und dem Konzentrationsgradienten (**Gleichung 2-1**).

$$j|_{LF} = -D * \frac{\partial c}{\partial z} \quad \text{[Gleichung 2-1]}$$

Die „light-dark shift“ Methode ermöglicht darüber hinaus die Berechnung der benthischen Bruttophotosynthese mit einer hohen vertikalen Auflösung. Die Sauerstoffkonzentration ($c_{(z,t)}$) in der Tiefe (z) und zu der Zeit (t) im System wird durch das Zusammenwirken der Sauerstoffproduktion ($P_{(z)}$), der Sauerstoffzehrung ($R_{(z)}$) und der Diffusion bestimmt. Mathematisch lässt sich dieser Zustand durch das zweite Fick'sche Gesetz beschreiben:

$$\frac{\partial c_{(z,t)}}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 c_{(z,t)}}{\partial z^2} + P_{(z)} - R_{(z)} \quad [\text{Gleichung 2-2}]$$

Wenn sich das System im stationären Zustand befindet, ist die Sauerstoffkonzentrationsänderung gleich Null:

$$\frac{\partial c_{(z,t)}}{\partial t} = 0 \quad [\text{Gleichung 2-3}]$$

Dadurch vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$P_{(z)} = R_{(z)} - D_s \frac{\partial^2 c_{(z,t)}}{\partial z^2} \quad [\text{Gleichung 2-4}]$$

Nach Ausschalten des Lichtes findet keine Photosynthese statt ($P_{(z)} = 0$), dadurch bekommt **Gleichung 2-2** die Form:

$$\frac{\partial c_{(z,t)}}{\partial t} = - \left[R_{(z)} - D_s \frac{\partial^2 c_{(z,t)}}{\partial z^2} \right] \quad [\text{Gleichung 2-5}]$$

Diese Gleichung gleicht bis auf das Minuszeichen der **Gleichung 2-4** für die Photosynthese im steady state, vorausgesetzt, dass die Respiration ($R_{(z)}$) und der Diffusionsterm sich nicht verändern. Unter der Annahme, dass auch die Respirationsrate ($R_{(z)}$) in den ersten Sekunden der Verdunkelung konstant bleibt, lässt sich die photosynthetische Aktivität durch die Vereinigung der beiden **Gleichungen 2-4 und 2-5** sehr einfach bestimmen (Revsbech & Jørgensen 1986):

$$P_{(z)} = - \frac{\partial c_{(z,t)}}{\partial t} \quad [\text{Gleichung 2-6}]$$

Die Photosynthese $P_{(z)}$ ist von den in der jeweiligen Tiefe vorhandenen Algen und ihrer Aktivität abhängig. Der Volumenanteil der Algen am Ort z kann durch die konfokale Laser Scanning Mikroskopie ermittelt werden.

Unabhängig von der Respiration kann somit die photosynthetische Aktivität indirekt über den Sauerstoffkonzentrationsabfall nach der Abdunkelung des Biofilms gemessen werden. Das zu untersuchende System muss sich vor der Verdunkelung im „steady state“ befinden. Der Sauerstoffverbrauch und die Diffusion im Biofilm müssen vor und während der Dunkelphase konstant sein.

Probenahme

Für die Mikroelektrodenmessungen an Ehle-Biofilmen wurden die Polykarbonatprobenträger von den Aufwuchsträgern genommen und vorsichtig in Ehle-Wasser ins Labor transportiert. Danach wurden die Proben sofort in einer Fließzelle platziert. Die Fließzelle wurde mit Ehle-Wasser geflutet. Die Mikroelektrodenmessungen erfolgten erst nach einer Inkubationszeit von 30 min, damit sich ein Gleichgewicht in den Biofilmproben einstellen konnte. Auf Grund der sehr geringen Biofilmdicken der Ehle-Biofilme während der Sommermonate, konnten hier Sauerstoffprofile nur zwischen Dezember 2000 und April 2001 aufgenommen werden.

Die Untersuchungen zum Sauerstoffhaushalt der Biofilme aus dem South-Saskatchewan-River in Kanada erfolgten ausschließlich in Biofilmen gewachsen auf natürlichen Substraten. Hierfür wurden Holz und Muscheln aus der Flussmitte sowie vom Flussrand gesammelt und

umgehend ins Labor transportiert, wo sie ebenfalls in einer Fließzelle plaziert wurden. Diese Untersuchungen erfolgten im Juli 2001.

Versuchsaufbau

Die Messungen wurden in einer selbst konstruierten Fließzelle bei einer Fließgeschwindigkeit entsprechend den Bedingungen in der Ehle von 15 cm/sec durchgeführt, da die Sauerstoffprofile im Biofilm und vor allem in der darüberliegenden Diffusionsschicht sehr von den vorherrschenden Strömungsbedingungen abhängig sind. Zur präzisen Positionierung der Mikroelektrode wurde ein Mikromanipulator (Unisense, Dänemark) verwendet, welcher an einem stabilen Stativ befestigt wurde. Das Signal der Mikroelektroden wurde mit Hilfe eines Picoampermeters (Unisense, Dänemark) gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet. Zur optischen Kontrolle der Elektrodenposition wurde ein Binokular (Zeiss, Jena) verwendet. Die Mikroelektrodenmessungen fanden in einer Klimakammer bei 13,5 °C statt, um eine konstante Temperatur während des Experimentes zu gewährleisten.

Vor Beginn der Messungen wurde die Mikroelektrode polarisiert und kalibriert. Vor der Polarisation enthält die Elektrolytlösung Sauerstoff. Dieser muss durch die Messkathode und Schutzkathode verbraucht werden bevor stabile Bedingungen sowie ein konstantes Signal der Mikroelektrode gewährleistet werden kann. Dafür wurde die Mikroelektrode für einige Stunden bei 800 mV polarisiert, bis sich ein stabiles Signal eingestellt hat, die Drift des Messsignals sollte nicht mehr als 1-2 % pro Tag betragen. Nach der Polarisierung der Mikroelektrode erfolgte die Kalibrierung. Da eine lineare Abhängigkeit zwischen Sauerstoffkonzentration und Stromstärke besteht, ist eine Zweipunktkalibrierung der Sauerstoffmikroelektrode ausreichend. Dafür wurde eine Lösung mit definierter Sauerstoffkonzentration verwendet. Zur Bestimmung des Nullstroms wurde das Wasser im Kalibrierungsgefäß mit Stickstoff begast. Vor jedem Start einer Meßserie erfolgte eine Kalibrierung des Sensors, da die Permeabilität der Membran sich mit der Zeit verändern kann. Für die Bestimmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion wurde das Licht für 15 Sekunden ausgeschaltet und die Sauerstoffkonzentrationsabnahme verfolgt. Nach dem Anschalten des Lichtes musste gewartet werden bis die vor der Abdunkelung gemessene Sauerstoffkonzentration wieder erreicht war. Erst danach wurde an der nächsten Position im Biofilm die Prozedur wiederholt.

2.5 Modellierung mit AQUASIM

Für die Simulation des Biofilmwachstums sowie der Sauerstoffproduktion durch photosynthetische Aktivität im Biofilm wurde das Simulationsprogramm AQUASIM (Reichert 1994) verwendet. Der Biofilmmodellteil des Programms basiert auf dem von Wanner und Gujer (1986) entwickelten Biofilmmodell.

Das Wachstum und der Transport der Mikroorganismen sowie der partikulären Komponenten (X_i) im Biofilm können mit einer Massebilanz beschrieben werden:

$$\frac{\partial X_i}{\partial t} = \frac{u_F \partial X_i}{\partial z} + r_{Xi} \quad [\text{Gleichung 2-7}]$$

u_F ist dabei die Geschwindigkeit mit der sich die Biofilmoberfläche auf Grund von Wachstum oder Lysis senkrecht zur Aufwuchsoberfläche bewegt. r_{Xi} ist die Umsatzrate der einzelnen partikulären Komponenten. Eine positive Geschwindigkeit eines Teilchens (X_i) im Biofilm resultiert aus einem Wachstum und der daraus folgenden Verdrängung der darüber liegenden Teilchen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit u_F des Biofilms wird berechnet aus der Summe aller Umsatzraten r_{Xi} der einzelnen partikulären Komponenten, die mit Hilfe der Biofilmdichte (Biotrockenmasse pro Biofilmvolumen) normiert werden:

$$u_F = u_{F0} + \int_0^{LF} \sum_{n=1}^i \frac{r_{Xi}}{\rho_x} \partial z \quad [\text{Gleichung 2-8}]$$

$$\text{mit } \rho = \frac{BTM}{V_{\text{Biofilm}}} \quad [\text{Gleichung 2-9}]$$

In dem hier verwendeten Model wird das Biofilmsystem in die Kompartimente Biofilm, Konzentrationsgrenzschicht und Wasserschicht unterteilt, in denen verschiedene Prozesse wie z.B. Stofftransport, -übergang und -umsatz stattfinden (Wilderer & Characklis, 1989). Der Aufbau dieses Biofilmsystems und die integrierten Prozesse sind in **Abb. 2-5** dargestellt.

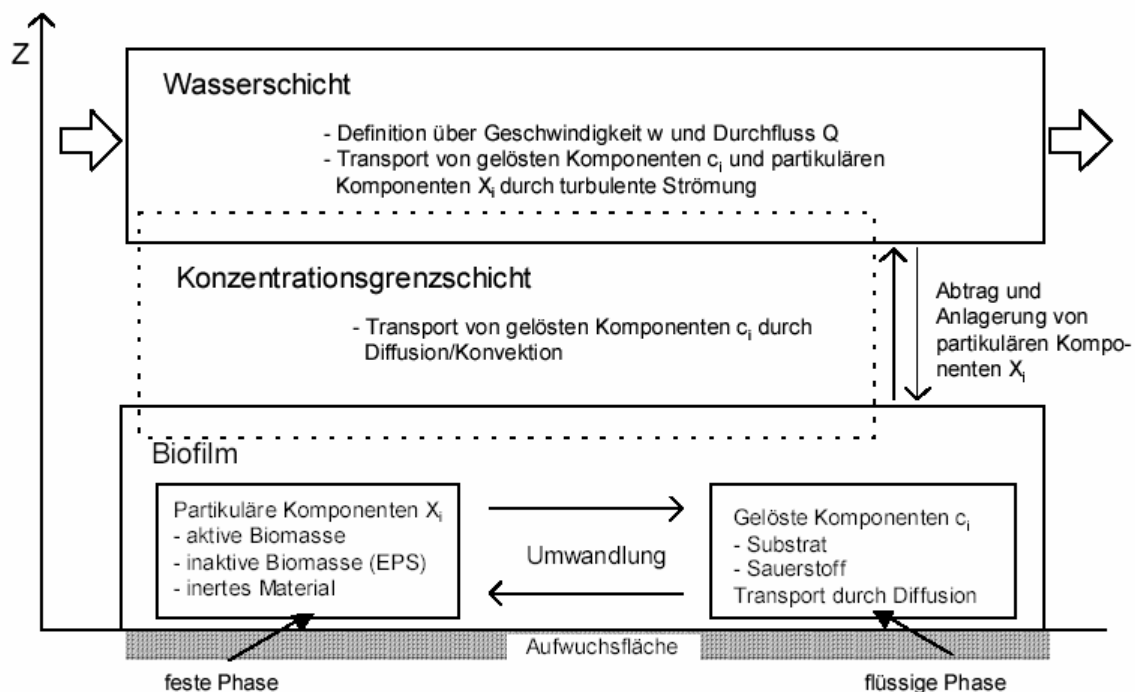


Abb. 2-5 Stoffumwandlungsprozesse im Biofilmsystem (Horn 1995)

Im Biofilmsystem wird zwischen der flüssigen Phase mit den gelösten Komponenten und der festen Phase mit den partikulären Komponenten unterschieden (Gujer & Wanner 1990). Als gelöste Komponenten spielen im benthischen Biofilm vor allem der Sauerstoff, organische Substanzen sowie Ammonium eine wichtige Rolle. Der Stoffumsatz und -transport der gelösten Komponenten im Biofilm wird mit Hilfe des zweiten Fick'schen Gesetzes beschrieben (**Gleichung 2-3**). Näherungsweise kann in der Grenzschicht Bulk/Biofilm der Transport der gelösten Komponenten mit Hilfe des ersten Fick'schen Gesetzes beschrieben werden:

$$j = -D * \frac{\partial c}{\partial z} \quad \text{[Gleichung 2-1]}$$

Dabei ist D der Diffusionskoeffizient, j die Massestromdichte und $\partial c / \partial z$ der Konzentrationsgradient. Durch Umstellen von **Gleichung 2-1** ergibt sich:

$$j = \beta(c_B - c_F) \quad \text{oder auch} \quad \frac{\partial c}{\partial z} = \frac{\beta}{D}(c_B - c_F) \quad \text{[Gleichung 2-10]}$$

β ist der Stoffübergangskoeffizient, c_B die Konzentration in der Bulkphase und c_F die Konzentration an der Biofilmoberfläche. **Gleichung 2-10** ist gleichzeitig die Randbedingung (an der Biofilmoberfläche $z = LF$) für die gelösten Komponenten im Modell von Wanner und Gujer (1986).

Die partikulären Komponenten können in aktive Biomasse, inaktive Biomasse und inertes Material unterschieden werden. Je nach Biofilmmodell wird die aktive Biomasse weiter unterteilt, z.B. in heterotrophe Bakterien, Nitrifizierer und Algen.

Neben dem Wachstum des Biofilms erfolgt in der Regel auch ein Ablösen von Biofilmpartikeln zum Beispiel in Folge von starker Scherbeanspruchung. Dies kann durch verschiedene Abtragsfunktionen im Modell berücksichtigt werden. Ein lineares Abtragsmodell wird häufig für die exponentielle Wachstumsphase des Biofilms verwendet. Es beschreibt einen kontinuierlichen Biomasseabtrag an der Biofilmoberfläche. Das Abreißen von großflächigen Biofilmstücken kann durch zufällige Abtragsereignisse modelliert werden und beschreibt einen diskontinuierlichen Erosionsprozess (Horn et al. 2003).

2.5.1 Simulation der jahreszeitlichen Entwicklung von Fließgewässerbiofilmen

Zunächst soll mit Hilfe von AQUASIM die Entwicklung des benthischen Biofilms in einem kleinen Fließgewässer simuliert werden. Vor allem die Änderung der Biofilmdicke im Verlauf des Jahres durch Wachstum und Biomasseabtrag sollte näher betrachtet werden. Zur Beschreibung des Wachstums, der Respiration und der Photosynthese wurde das IWA River Water Quality Model No. 1 verwendet. Die wichtigsten Mikroorganismen in den untersuchten benthischen Biofilmen waren Bakterien, Algen und Cyanobakterien. Für die Simulation wurden die Algen und die Cyanobakterien als eine Gruppe zusammengefasst und als photoautotrophe Mikroorganismen bezeichnet. Zusammen mit dem inerten Material (Glykokonjugate) bildeten sie die partikulären Komponenten in der festen Phase des Biofilms. In der flüssigen Phase wurden die gelösten Komponenten Sauerstoff und der gelöste organische Kohlenstoff ins Modell aufgenommen.

gelöste Komponenten:

c_{O_2} = Sauerstoffkonzentration (mg/l)

c_s = Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (mg DOC/l)

partikuläre Komponenten (X_i): X_H = heterotrophe Bakterien (g/m³) X_{Photo} = photoautotrophe Mikroorganismen (g/m³) X_I = inerte Substanzen (g/m³)

Die feste und die flüssige Phase werden als Volumenfraktionen (ε) des Biofilmvolumens angegeben. Im vorliegenden Beispiel wird angenommen, dass die feste Phase 30 % und die flüssige Phase 70 % des Biofilmvolumens ausmachen. Dies entspricht einer Volumenfraktion von 0,3 für die feste Phase und von 0,7 für die flüssige Phase (**Gleichung 2-11**). Diese Annahmen liegen im Bereich von Literaturangaben (Horn & Hempel 1997a, Horn et al. 2003, Zhang & Bishop 1994).

$$\varepsilon_{festePhase} + \varepsilon_{flüssigePhase} = 1 \quad [\text{Gleichung 2-11}]$$

Die partikulären Komponenten bilden die einzelnen Volumenfraktionen der festen Phase (**Gleichung 2-12**).

$$\varepsilon_{festePhase} = \varepsilon_H + \varepsilon_{Photo} + \varepsilon_I \quad [\text{Gleichung 2-12}]$$

 ε_H = Volumenfraktion der Bakterien ε_{Photo} = Volumenfraktion der photoautotrophe Mikroorganismen ε_I = Volumenfraktion der inerten Substanzen

Die einzelnen Volumenfraktionen werden aus der Biomasse X_i und der Biofilmdichte ρ_i ermittelt (**Gleichung 2-13**), wobei die Biofilmdichte ρ_i aus der Biotrockenmasse (BTM) und dem Biofilmvolumen ($V_{Biofilm}$) berechnet werden (**Gleichung 2-9**).

$$\varepsilon_i = \frac{X_i}{\rho_i} \quad [\text{Gleichung 2-13}]$$

 ρ_H = Biofilmdichte der Bakterien (gBTM/m³) ρ_{Photo} = Biofilmdichte der photoautotrophen Mikroorganismen (gBTM/m³) ρ_I = Biofilmdichte der inerten Substanzen (gBTM/m³)

In diesem Ansatz wird der benthische Biofilm mit dem Biofilmmodellteil in AQUASIM simuliert. Bei einer durchschnittlichen Wassertiefe der Ehle von 0,4 m beträgt das Reaktorvolumen 0,4 m³ bezogen auf eine Sedimentoberfläche von 1 m² und besitzt einen Wasserdurchfluss von 5000 m³ pro Tag. Die Simulation wurde über 500 Tage durchgeführt. Für die verschiedenen Monate wurden die gemessenen Wassertemperaturen des Fließgewässers übernommen.

Für die benthische Biofilmentwicklung sind die Prozesse Wachstum und Respiration von entscheidender Bedeutung, wobei die photosynthetische Sauerstoffbildung der photoautotrophen Mikroorganismen mit im Prozess Wachstum integriert wurde. Alle Prozesse wurden in Anlehnung an das IWA River Water Quality Model No.1 formuliert. Die verwendeten Koeffizienten und Parameter für die Simulation sowie Angaben aus der Literatur sind in **Tabelle 2-8** enthalten.

Das Wachstum der heterotrophen Mikroorganismen wurde durch die **Gleichung 2-14** beschrieben. Es ist abhängig von der maximalen Wachstumsrate der Bakterien (μ_H), der Bakterienbiomasse (X_H), der Substratkonzentration (c_S) sowie der Sauerstoffkonzentration (c_{O_2}):

$$\frac{\partial X_H}{\partial t} = \mu_H * X_H * e^{(0,07*(Temp - Temp_{20}))} * \frac{c_S}{K_S + c_S} * \frac{c_{O_2}}{K_{O_2} + c_{O_2}} \quad [\text{Gleichung 2-14}]$$

K_S und K_{O_2} sind die Halbsättigungskonstanten für das Substrat bzw. für Sauerstoff. Das Wachstum wurde außerdem an die Wassertemperatur gekoppelt. Temp ist die tatsächliche Wassertemperatur und Temp_20 die Bezugstemperatur (20 °C). Je geringer Temp ist, desto geringer ist das Wachstum der Bakterien.

Die Respiration der Bakterien, formuliert durch **Gleichung 2-15**, ist abhängig vom spezifischen Respirationskoeffizienten (k_{resp_H}), der Bakterienbiomasse, der Sauerstoffkonzentration sowie der Wassertemperatur:

$$\frac{\partial c_{O_2}}{\partial t} = -k_{resp_H} * X_H * e^{(0,07*(Temp - Temp_{20}))} * \frac{c_{O_2}}{K_{O_2} + c_{O_2}} \quad [\text{Gleichung 2-15}]$$

Das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen (Algen und Cyanobakterien) ist von der maximalen Wachstumsrate der photoautotrophen Mikroorganismen (μ_{Photo}), ihrer Biomasse (X_{Photo}) sowie der Wassertemperatur abhängig:

$$\frac{\partial X_{Photo}}{\partial t} = \mu_{Photo} * X_{Photo} * e^{(0,046*(Temp - Temp_{20}))} * I_Licht \quad [\text{Gleichung 2-16}]$$

Die Photosynthese und das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen sind vor allem von den vorherrschenden Lichtbedingungen abhängig. Ein integrierter Lichtfaktor (I_Licht) berücksichtigt den Tag/Nachtzyklus sowie seine Änderung in Abhängigkeit der Jahreszeit, er wird aus der durchschnittlichen Sonnenscheindauer berechnet und ist in **Tabelle 3-13** für jeden Monat dargestellt.

Die Sauerstoffproduktion durch die Photosynthese der photoautotrophen Mikroorganismen wird durch das Einfügen eines Ertragskoeffizienten in **Gleichung 2-16** berechnet.

Die Respiration der photoautotrophen Mikroorganismen (**Gleichung 2-17**) ist wiederum abhängig vom spezifischen Respirationskoeffizienten (k_{resp_Photo}), der Biomasse der photoautotrophen Mikroorganismen, der Sauerstoffkonzentration sowie der Wassertemperatur:

$$\frac{\partial c_{O_2}}{\partial t} = -k_{resp_Photo} * X_{Photo} * e^{(0,046*(Temp - Temp_{20}))} * \frac{c_{O_2}}{K_{O_2} + c_{O_2}} \quad [\text{Gleichung 2-17}]$$

Tabelle 2-8 In der Simulation verwendete Parameter sowie Angaben aus der Literatur

Parameter		Werte für die Simulation		Werte aus der Literatur	Literatur
Wachstumsgeschwindigkeit					
het. Bakterien	μ_H	1	d ⁻¹	1,2 – 6	Horn et al. 2001, Arcangeli & Arvin 1999
photoautotr. Mikroorganismen	μ_{Photo}	2	d ⁻¹	2	Reichert et al. 2001
Respirationskoeffizienten					
het. Bakterien	k_{resp_H}	0,2	d ⁻¹	0,2	Reichert et al. 2001
photoautotr. Mikroorganismen	k_{resp_Photo}	0,1	d ⁻¹	0,1	Reichert et al. 2001
Monod – Konstanten:					
Sauerstoff	K_{O_2}	0,2	g m ⁻³	0,2	Horn et al. 2001, Arcangeli & Arvin 1999
gelöste organische Substanzen	K_S	2	g m ⁻³	2	Reichert et al. 2001
Diffusionskoeffizienten:					
Sauerstoff	D_{O_2}	2,1*10 ⁻⁴	m ² d ⁻¹	1,73 – 2.2 *10 ⁻⁴	Horn et al. 2001, Arcangeli &Arvin 1999
gelöste organische Substanzen	D_S	0,5*10 ⁻⁴	m ² d ⁻¹	-	-
Startwert Biofilmdicke					
LF_{ini}		30	µm	-	-
Dichte für die feste Phase im Biofilm:					
het. Bakterien	ρ_H	40	kg m ⁻³	24-60	Horn et al. 2001, Horn & Hempel 1996/1997a
photoautotr. Mikroorganismen	ρ_{Photo}	40	kg m ⁻³		
inertes Material	ρ_I	40	kg m ⁻³	24-62	Horn et al. 2001, Horn & Hempel 1996/1997a
Startbedingung für die Volumen-Fraktion der festen Phase					
het. Bakterien	ε_H	0,1	-	-	-
photoautotr. Mikroorganismen	ε_{Photo}	0,1	-	-	-
inerte Material	ε_I	0,1	-	-	-
stoichiometrische Koeffizienten					
Wachstum					
het. Bakterien					
Sauerstoff		-0,85	gO gX ⁻¹	-0,85	Reichert et al. 2001
gelöste organische Substanzen		-1,9	gS gX ⁻¹	-1,9	Reichert et al. 2001
photoautotr. Mikroorganismen					
Sauerstoff		1,3	gO gX ⁻¹	1,3	Reichert et al. 2001
Respiration					
het. Bakterien					
Sauerstoff		-0,77	gO gX ⁻¹	-0,77	Reichert et al. 2001
photoautotr. Mikroorganismen					
Sauerstoff		-0,6	gO gX ⁻¹	-0,6	Reichert et al. 2001

Die Wachstumsgeschwindigkeit des Biofilms wird in diesem Modell vor allem durch Nährstofflimitation, niedrige Wassertemperatur und geringe Lichtintensitäten beschränkt. In natürlichen Gewässern gibt es noch andere Faktoren, die das Wachstum des Biofilms begrenzen. Ein wichtiger Faktor ist ein kontinuierlicher Abtrag von Biomasse. Wenn die externen Kräfte an der Biofilmoberfläche größer sind als die internen Kräfte, die den Biofilm zusammenhalten, kann es zum Ablösen von Biofilmstücken kommen. Diese Abrasion ist auch

von dem Biofilmdicken selbst abhängig. Im Biofilmmodell kann der Biofilmaustrag über einen Austragskoeffizienten k_d an die Wachstumsgeschwindigkeit u_F (**Gleichung 2-8**) des Biofilms gekoppelt werden (Horn et al. 2003):

$$\frac{\partial LF}{\partial t} = u_F * k_d \quad \text{[Gleichung 2-18]}$$

Der Austragskoeffizient k_d kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen (Horn et al. 2003). Besitzt der Austragskoeffizient den Wert 0, findet kein Biomasseabtrag statt. Das Biofilmwachstum ist damit unbeschränkt. Bei einem Wert von 1 bleibt die Biofilmdicke konstant, d.h. die Menge an Biomasse die durch Wachstum entsteht wird sofort abgetragen.

Ein zusätzlicher Abtrag von Biomasse kann durch Makrozoobenthosorganismen hervorgerufen werden. Einige Arten ernähren sich vor allem vom benthischen Biofilm. Bei einer hohen Individuenzahl kann dies zu einer erheblichen Abweidung des Biofilms führen. Zu den unterschiedlichen Jahreszeiten müssen die verschiedenen Abtragsereignisse durch Abtragsmodelle berücksichtigt werden.

2.5.2 Simulation der Sauerstoffkonzentrationsprofile und der photosynthetischen Aktivität im benthischen Biofilm

Weiterhin sollen die Sauerstoffproduktion und die daraus resultierenden Sauerstoffkonzentrationsprofile im benthischen Biofilm simuliert werden. Die beiden entscheidenden Prozesse sind hier die Photosynthese und die Respiration.

Für die Simulation ist nur ein einfaches Biofilmmodell erforderlich. Da die Änderung der Sauerstoffkonzentration nur zu einem bestimmten Zeitpunkt wiedergegeben werden soll, kann der Prozess des Wachstums der Biofilmkomponenten vernachlässigt werden. Die aktuelle Verteilung der Biofilmkomponenten wurde durch die konfokale Laser Scanning Mikroskopie ermittelt und ins Modell integriert. Da die ermittelte Bakterienfraktion sehr klein war, wurden als partikuläre Komponenten nur die photoautotrophen Mikroorganismen ins Biofilmmodell eingefügt. Außerdem war es ausreichend von den gelösten Komponenten nur den Sauerstoff zu betrachten.

Gelöste Substanzen:

c_{O_2} = Sauerstoffkonzentration (g/m^3)

Partikuläre Substanzen:

X_{Photo} = photoautotrophe Mikroorganismen (g/m^3)

X_I = inerte Substanzen (g/m^3)

Somit sind in dieser Simulation die photoautotrophe Mikroorganismen und die inerten Substanzen die einzigen Volumenfraktionen der festen Phase (im Vergleich zur ersten Simulation **Gleichung 2-12**):

$$\varepsilon_{feste Phase} = \varepsilon_{Photo} + \varepsilon_I \quad \text{[Gleichung 2-19]}$$

ε_{Photo} = Volumenfraktion der photoautotrophen Mikroorganismen

ε_I = Volumenfraktion der inerten Substanzen

Die Volumenfraktion der festen Phase wurde auf 0,1 festgelegt, da die Biofilme im Vergleich zu den Ehle-Biofilmen eine deutlich lockere Struktur aufwiesen. Das Volumen der photoautotrophen Mikroorganismen wurde mit Hilfe des CLSM für jede Biofilmschicht (je 50

μm) bestimmt. Die Gesamtfraction der festen Phase bleibt durch die Anpassung der Volumenfraction der inerten Substanzen in jeder Biofilmschicht gleich.

Die Änderung der Sauerstoffkonzentration wurde simuliert für einen Biofilmreaktor mit einer Biofilmoberfläche von 1 m^2 und einem Reaktorvolumen von 1 m^3 . Die Simulationszeit betrug 2000 Sekunden. Die Sauerstoffproduktion durch die Photosynthese der photoautotrophen Mikroorganismen wurde nach **Gleichung 2-20** berechnet:

$$\frac{\partial c_{O_2}}{\partial t} = \mu_{Photo} * X_{Photo} * e^{(0,046 * (Temp - Temp_{20}))} * Licht_{on/off} \quad [\text{Gleichung 2-20}]$$

Sie ist abhängig von der Biomasse der photoautotrophen Mikroorganismen (X_{Photo}) und der maximalen Wachstumsrate der Photosynthese (μ_{photo}). Außerdem ist sie abhängig vom Licht ($Licht_{on/off}$), welches entweder an (on=1) oder aus (off=0) sein kann.

Als zweiter Prozess wurde die Respiration berücksichtigt, welche sich ebenfalls nur auf die photoautotrophen Mikroorganismen bezieht (**Gleichung 2-17**). Bei der Respiration wird Sauerstoff für die Aufrechterhaltung des Energiestatus verbraucht. Sie ist abhängig von der Biomasse der photoautotrophen Mikroorganismen, dem spezifischen Respirationskoeffizienten (k_{resp}), der Temperatur und der Sauerstoffkonzentration (c_{O_2}):

$$\frac{\partial c_{O_2}}{\partial t} = -k_{resp} * X_{Photo} * e^{(0,046 * (Temp - Temp_{20}))} * \frac{c_{O_2}}{K_{O_2} + c_{O_2}} \quad [\text{Gleichung 2-17}]$$

In **Tabelle 2-9** sind alle für die Simulation der Sauerstoffkonzentrationsprofile und der photosynthetischen Aktivität verwendeten Koeffizienten/Parameter dargestellt. Außerdem sind Literaturwerte in der Tabelle enthalten.

Tabelle 2-9 In der Simulation verwendete Parameter sowie Angaben aus der Literatur

Parameter		Werte für die Simulation	Werte aus der Literatur	Literatur
Respirationskoeffizient				
photoautotr. Mikroorganismen	k_{resp}	angepasst	$1,16 * 10^{-6}$	Reichert et al. 2001
Wachstumsgeschwindigkeit				
photoautotr. Mikroorganismen	μ_{Photo}	$2,5 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$2,31 * 10^{-5}$	Reichert et al. 2001
Ertragskoeffizient				
Respiration		-0,6 gO gX ⁻¹	-0,6	Reichert et al. 2001
Photosynthese		1,3 gO gX ⁻¹	1,3	Reichert et al. 2001
Monod – Konstante:				
Sauerstoff	K_{O_2}	0,2 g m ⁻³	0,2	Horn et al. 2001, Arcangeli & Arvin 1999 Reichert et al. 2001
Diffusionskoeffizient:				
Sauerstoff	D_{O_2}	$2,1 * 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$	$1,73 - 2,2 * 10^{-4}$	Horn et al. 2001, Arcangeli & Arvin 1999,
Dichte für die feste Phase im Biofilm:				
photoautotrophe	ρ_{Photo}	95 kg m ⁻³	79-102	Horn 1999
inert	ρ_I	60 kg m ⁻³	24-62	Horn et al. 2001, Horn & Hempel 1996/1997a
Volumen-Fractionen der festen Phase				
heterotroph, autotroph, inert	ε_i	mit der CLSM ermittelt	-	-

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungsgebiet

Im Mittellaufbereich der Ehle wurden an mehreren Standorten Wasserproben entnommen und Untersuchungen zum Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorhaushalt durchgeführt. Die gemessenen Daten sind der **Tabelle 3-1** zu entnehmen.

Tabelle 3-1 Nährstoffuntersuchungen der Ehle an mehreren Standorten vom 05.04.2000 (Angaben in mg/l)

	Ehle 01	Ehle 02	Ehle 03	Ehle 04	Ehle 05	Ehle 06	Ehle 07
DOC	5,6	5,2	5,4	5,5	6,1	6,1	6
TOC	7,1	6,5	6,7	6,9	7,3	7,1	7,2
NH ₄ -N	0,10	0,46	0,20	0,31	0,13	0,10	0,11
NO ₂ -N	0,025	0,029	0,045	0,058	0,092	0,090	0,082
NO ₃ -N	5,17	5,00	5,06	5,46	9,45	9,47	9,13
SRP	<0.003	<0.003	0,008	0,010	0,007	0,010	0,011
TP	0,10	0,13	0,12	0,14	0,12	0,16	0,12

Der gelöste organische Kohlenstoff wies im oberen Bereich der Ehle (Ehle 01 bis Ehle 04) geringere Konzentrationen auf als im unteren Gewässerabschnitt (Ehle 05 bis Ehle 07). Ebenso konnte dies beobachtet werden bei der Nitrit- und bei der Nitrat-Konzentration. Die Ammonium-Konzentration lag jedoch im oberen Abschnitt meist höher. Die beiden Untersuchungsstandorte (Ehle 02 und Ehle 04) unterschieden sich in den Parametern Ammonium, Nitrit und Nitrat. Das Sediment am Standort Ehle 02 war vor allem während der Sommermonate mit einer Schlammschicht bedeckt. Das Wasser an diesem Standort war oft sehr trüb. Am Standort Ehle 04 war das Sediment sandig und das Wasser meist klar. Während der Sommermonate kam es zu einem starken Makrophytenwachstum an diesem Untersuchungsstandort. **Abb. 3-1** vermittelt einen Eindruck von den beiden Standorten Ehle 02 und Ehle 04.



Abb. 3-1 Probenahmestandorte Ehle 02 bei Loburg (links) und Ehle 04 bei Möckern (rechts)

3.1.1 Standortparameter

Während des Zeitraums der Biofilmuntersuchungen in der Ehle wurden die Standortparameter Fließgeschwindigkeit, Wassertiefe, Wassertemperatur, Sauerstoffgehalt, pH-Wert und die elektrische Leitfähigkeit wöchentlich an den beiden Untersuchungsstandorten bestimmt (**Tabelle 3-2**). Die Wassertiefe am Standort Ehle 02 war gegenüber der am Standort Ehle 04 im Untersuchungszeitraum immer deutlich höher, da die Fließgewässerbreite hier geringer ist. Der Standort Ehle 04 liegt ca. 10 km flussabwärts vom Standort Ehle 02 entfernt, hier wurde eine höhere Wassertemperatur um ca. 1 °C gemessen. Die elektrische Leitfähigkeit lag mit durchschnittlichen 710 µS/cm am Standort Ehle 04 signifikant über der am Standort Ehle 02. Diese Erhöhung hat wahrscheinlich geogene Ursachen.

Tabelle 3-2 Gewässerparameter an den Standorten Ehle 02 und Ehle 04 (Durchschnittswerte des Jahres 2000)

	Ehle 02				Ehle 04			
	Mittelwert	+/-	min	max	Mittelwert	+/-	min	max
Fließgeschw. [m/s]	0,20	0,10	0,09	0,41	0,23	0,10	0,12	0,58
Tiefe [m]	0,43	0,12	0,28	0,62	0,37	0,08	0,25	0,56
Temp. [°C]	11,02	3,06	3,50	15,30	12,27	3,71	4,10	16,30
O ₂ -Gehalt [mg/l]	8,90	1,58	5,02	11,95	8,05	1,37	5,50	10,79
pH	7,54	0,11	7,30	7,70	7,47	0,09	7,30	7,62
elekt. Leitf. [µS/cm]	580	19	547	614	710	28,76	641	760

3.1.2 Wasseranalysen

Während des Untersuchungszeitraums wurden an den beiden Standorten Ehle 02 und Ehle 04 Wasseranalysen zur Bestimmung des TOC, DOC, NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N, SRP und TP durchgeführt. Diese sind in **Tabelle 3-3** für den Standort Ehle 02 und in **Tabelle 3-4** für den Standort Ehle 04 dargestellt. Der gelöste sowie der gesamte organische Kohlenstoffgehalt im Fließgewässer Ehle waren am Standort Ehle 04 im Untersuchungszeitraum stets höher. Dagegen war die Konzentration von Ammonium am Standort Ehle 02 deutlich höher. Die Werte zeigten eine saisonale Schwankung. Vor allem im Frühjahr wurden sehr hohe durchschnittliche Monatsmittelkonzentrationen bis zu 0,99 mg/l an diesem Standort bestimmt, wobei Einzelkonzentrationen Werte bis zu 3 mg Ammonium pro Liter erreichten. Im Sommer wurden hingegen nur geringe Ammoniumkonzentrationen an diesem Standort gemessen. Am Standort Ehle 04 waren diese Schwankungen nicht so stark ausgeprägt. Hier betrugen die Monatsmittelkonzentrationen höchstens 0,28 mg Ammonium pro Liter, wobei in den Sommermonaten die Konzentrationen nochmals deutlich geringer waren. Nitrit wies an beiden Standorten während des gesamten Jahres nur sehr geringe Konzentrationen auf, oft nahe der Nachweisgrenze. Die Nitratkonzentration zeigte sehr deutlich ausgeprägte jahreszeitliche Schwankungen. Von Januar bis April wurden sehr hohe Konzentrationen von bis zu 5 mg/l gemessen, während in der restlichen Zeit nur Konzentrationen um 1 mg/l ermittelt wurden. Das Gesamt-Phosphat (TP) sowie das gelöste reaktive Phosphat (SRP) waren an beiden Standorten sehr gering und zeigten während des Jahres nur geringe Schwankungen.

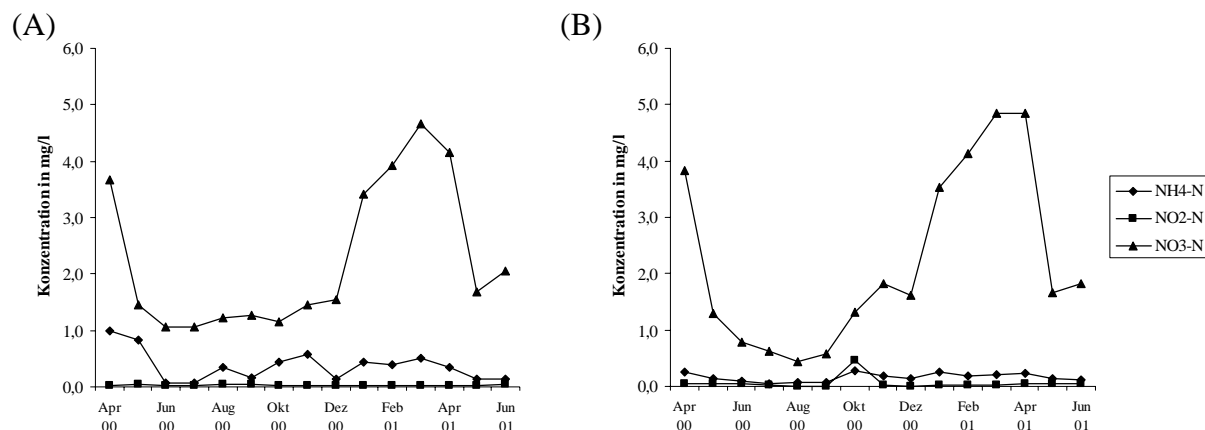
Tabelle 3-3 Jahreszeitliche Variationen der Nährstoffkonzentrationen im Ehlewasser am Standort Ehle 02 im Zeitraum vom April 2000 bis April 2001 (Monatsmittelwerte in mg/l)

	Apr 00	Mai 00	Jun 00	Jul 00	Aug 00	Sep 00	Okt 00	Nov 00	Dez 00	Jan 01	Feb 01	Mrz 01	Apr 01
DOC	4,70	3,98	3,43	3,05	3,86	3,63	3,75	3,40	3,90	4,45	4,95	5,38	5,60
TOC	6,48	4,60	5,10	4,25	4,40	4,20	4,43	3,44	4,60	5,95	5,30	6,25	6,40
NH ₄ -N	0,99	0,82	0,07	0,08	0,35	0,17	0,45	0,59	0,14	0,43	0,39	0,51	0,35
NO ₂ -N	0,03	0,05	0,02	0,02	0,05	0,04	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03
NO ₃ -N	3,68	1,46	1,06	1,06	1,22	1,28	1,16	1,46	1,55	3,42	3,92	4,65	4,14
TP	0,16	0,17	0,16	0,12	0,14	0,09	0,09	0,05	0,05	0,10	0,07	0,07	0,08
SRP	0,04	0,09	0,05	0,07	0,06	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01

Tabelle 3-4 Jahreszeitliche Variationen der Nährstoffkonzentrationen im Ehlewasser am Standort Ehle 04 im Zeitraum vom April 2000 bis April 2001 (Monatsmittelwerte in mg/l)

	Apr 00	Mai 00	Jun 00	Jul 00	Aug 00	Sep 00	Okt 00	Nov 00	Dez 00	Jan 01	Feb 01	Mrz 01	Apr 01
DOC	5,25	4,92	4,95	4,95	5,16	5,13	5,10	4,30	4,60	5,23	5,05	5,88	6,20
TOC	6,65	5,46	5,33	5,35	5,20	5,20	5,63	4,48	4,70	5,90	5,50	6,45	6,43
NH ₄ -N	0,26	0,14	0,10	0,05	0,07	0,06	0,28	0,19	0,13	0,26	0,19	0,20	0,23
NO ₂ -N	0,05	0,04	0,04	0,02	0,01	0,01	0,47	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04
NO ₃ -N	3,83	1,30	0,78	0,63	0,45	0,58	1,31	1,81	1,61	3,54	4,12	4,85	4,85
TP	0,14	0,10	0,08	0,06	0,05	0,05	0,11	0,10	0,10	0,11	0,10	0,09	0,09
SRP	0,04	0,05	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01

In der graphischen Darstellung der Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentrationen (**Abb. 3-2**) werden die jahreszeitlichen Schwankungen im Stickstoffhaushalt des Gewässers deutlich. Diese werden vor allem durch die Düngung der umliegenden Äcker Anfang des Jahres in dem sehr stark landwirtschaftlich genutzten Einzugsgebiet hervorgerufen. Zu dieser Jahreszeit können die Nährstoffe auf Grund fehlender Vegetation nur gering im Boden festgehalten werden. Der größte Teil wird ausgewaschen und gelangt so in die Gewässer. Die Nährstoffdüngungen während der Sommermonate können durch die Vegetation besser verwendet bzw. festgehalten werden. Zu dieser Zeit kommt es zu einem geringeren Nährstoffeintrag in die umliegenden Gewässer.

**Abb. 3-2** Darstellung der Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentrationen an den Standorten Ehle 02 (A) und Ehle 04 (B) im Untersuchungszeitraum vom April 2000 bis Juni 2001.

Am Beginn des Untersuchungszeitraums wurde eine umfangreiche Wasseranalyse an drei Standorten an der Ehle durchgeführt. Fast alle untersuchten Parameter wiesen eine Zunahme in ihrer Konzentration entlang der Ehle auf (**Tabelle 3-5**). Eine der wenigen Ausnahmen war

die Ammoniumkonzentration, welche von 0,46 mg/l am ersten untersuchten Standort auf 0,11 mg/l innerhalb von 26,4 km sank. Die totale Phosphorkonzentration sank nur um 0,02 mg/l. Außerdem nahmen die Aluminiumkonzentration und die Eisenkonzentration ab.

Tabelle 3-5 Nährstoffkonzentrationen bzw. Elementkonzentrationen des Ehlewassers an verschiedenen Standorten

		Ehle 02	Ehle 04	Ehle 07
Ba_gelöst	µg/l	57	56	62
Ba_gesamt	µg/l	66	63	69
Ca ²⁺	mg/l	104	124	155
K ⁺	mg/l	8,33	9,86	12,3
Mg ²⁺	mg/l	7,94	10,9	17,7
Na ⁺	mg/l	18,1	26,6	36,8
Cl ⁻	mg/l	40,6	52,3	74,5
SO ₄ ²⁻	mg/l	160	195	270
DOC	mg/l	5,2	5,5	6
TOC	mg/l	6,5	6,9	7,2
NH ₄ -N	mg/l	0,46	0,31	0,11
NO ₂ -N	mg/l	0,029	0,058	0,082
NO ₃ -N	mg/l	5,00	5,46	9,13
SRP	mg/l	<0.003	0,010	0,011
TN	mg/l	7,31	7,53	12,5
TP	mg/l	0,13	0,14	0,12
Al_gelöst	µg/l	< 100	< 100	< 100
Al_gesamt	µg/l	148	118	86
As_gesamt	µg/l	< 1.0	1,5	1,1
As_gelöst	µg/l	< 1.0	< 1.0	< 1.0
Cd_gelöst	µg/l	< 0.20	0,23	0,20
Cd_gesamt	µg/l	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Co_gelöst	µg/l	0,32	0,36	0,48
Co_gesamt	µg/l	0,26	0,34	0,42
Cu_gelöst	µg/l	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Cu_gesamt	µg/l	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Cr_gelöst	µg/l	< 0.20	< 0.20	2,2
Cr_gesamt	µg/l	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Fe_gelöst	µg/l	66	69	82
Fe_gesamt	µg/l	923	762	677
Mn_gelöst	µg/l	159	166	168
Mn_gesamt	µg/l	140	143	140
Ni_gelöst	µg/l	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Ni_gesamt	µg/l	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Pb_gelöst	µg/l	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Pb_gesamt	µg/l	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Zn_gelöst	µg/l	< 10	< 10	< 10
Zn_gesamt	µg/l	< 10	< 10	< 10

3.1.3 Makrozoobenthos

Das Vorkommen und die Abundanzen vieler Makrozoobenthos-Arten werden als Indikatoren zur Beurteilung der Gewässergüte genutzt. Dieses Saprobien-system entwickelte sich zum Standardwerkzeug der Gewässergüteüberwachung. Das Makrozoobenthos der Ehle wurde 1996 vom Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt eingehend untersucht. Seit dieser Zeit hat sich die Wasserqualität der Ehle durch Verbesserungen in der Abwasserbehandlung sowie durch Schließung von Industrieanlagen wesentlich verbessert. Eine daraus resultierende Verschiebung der Makrozoobenthos-Artengemeinschaft sollte stichprobenartig kontrolliert werden. Bei diesen Untersuchungen wurden Makrozoobenthos-Arten der Gruppen Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Bivalvia, Gastropoda, Hirundinea, Crustacea, Odonata und Oligochaeta gefunden. Die Anzahl der taxonomisch bestimmten Arten in jeder Organismengruppe zeigt **Tabelle 3-6**. Ebenfalls enthalten sind alle Arten, die bei der Untersuchung des Landesamtes für Umweltschutz Sachsen-Anhalt 1996 in der gesamten Ehle sowie in den Bereichen der beiden Untersuchungsstandorten bestimmt wurden. Die Probenahmestelle bei Loburg (Ehle 02) wurde mit einer Gewässergüte von II-III, die Probenahmestelle bei Möckern (Ehle 04) mit einer Gewässergüte von II bewertet (Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt 1997).

Tabelle 3-6 Vergleich der Artenvielfalt einzelner Organismengruppen zwischen den Jahren 1996 (Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt 1997) und 2002

Tiergruppe	Untersuchungen des Landesamtes für Umweltschutz Sachsen-Anhalt 1996			eigene Untersuchung 2002		
	Ehle-gesamt	Ehle 02	Ehle 04	Ehle 02	Ehle 04	Summe
<i>Ephemeroptera</i>	14	3	2	1	3	3
<i>Trichoptera</i>	16	3	3	9	5	9
<i>Diptera</i>	12	5	0	3	3	4
<i>Bivalvia</i>	9	1	1	1	1	2
<i>Gastropoda</i>	20	5	5	3	1	3
<i>Hirundinea</i>	9	4	2	2	3	3
<i>Crustacea</i>	3	2	2	3	3	3
<i>Odonata</i>	5	0	1	0	1	1
<i>Oligochaeta</i>	4	3	0	1	1	1
Summe der Taxa	92	26	16	23	21	29

Beide Untersuchungsstandorte können zum Mittellaufbereich der Ehle gezählt werden. In diesem Bereich kann man die Ehle als ein stark ausgebautes Fließgewässer aufgrund ihres begradigten und strukturarmen Laufes bezeichnen. Bei vielen Organismengruppen wurden 1996 (Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt 1997) in diesem Bereich deutlich geringere Artenanzahlen gegenüber anderen Streckenabschnitten gefunden. An den beiden Untersuchungsstandorten wurden 2002 insgesamt 29 Makrozoobenthos-Arten gefunden, wobei sich beide Standorte in ca. der Hälfte der Arten unterschieden. 17 Makrozoobenthos-Arten wurden sowohl 1996 als auch 2002 hier nachgewiesen. Von den 12 an den Untersuchungsstandorten neu gefundenen Arten sind 7 Arten 1996 in keinem Ehlebereich bestimmt wurden. Die **Tabelle 3-7** zeigt alle Makrozoobenthos-Arten aus den Untersuchungen des Landesamtes für Umweltschutz Sachsen-Anhalt vom Jahr 1996 und aus den eigenen Untersuchungen vom Jahr 2002.

Tabelle 3-7 Vorkommen der Makrozoobenthos-Taxa 2002 im Vergleich mit den Untersuchungen vom Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt von 1996 an den Standorten Ehle 02 und Ehle 04 sowie ihre Saprobienindices (S-Index; Nagel 1989, Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt 1997, Waringer & Graf 1997)

EHLE	Landesamt für Umwelt- schutz Sachsen-Anhalt 1996			eigene Untersuchung 2002				S-Index
	gesamt	02	04	02 Individuen pro m ²	04 Individuen pro m ²	Stein 02 Anzahl an Individuen	Stein 04 Anzahl an Individuen	
<i>Ephemeroptera</i>								
<i>Baetis rhodani</i>	x	x	x	2,34			6x	2,3
<i>Baetis vernus</i>	x	x						2,1
<i>Baetis spec.</i>	x	x	x					
<i>Caenis horaria</i>	x							
<i>Caenis mac/luc</i>	x							
<i>Caenis robusta</i>	x							
<i>Caenis spec.</i>	x							
<i>Centroptilum luteolum</i>	x							1,9
<i>Cloeon dipterum</i>	x							2,2
<i>Cloeon simile</i>	x							2,2
<i>Ephemera danica</i>	x			10,16	18,75		1x	1,8
<i>Ephemera vulgata</i>	x							
<i>Heptagenia sulphurea</i>	x							2,0
<i>Trichoptera</i>								
<i>Anabolia nervosa</i>	x	x		29,69	36,72			2,1
<i>Athripsodes aterrimus</i>	x							2,4
<i>Athripsodes cinereus</i>	x							2,1
<i>Athripsodes sp.</i>	x							
<i>Ceraclea sp.</i>	x							
<i>Chaetopteryx villosa</i>	x			0,78	0,78			1,7
<i>Chaetopterygopsis maclachla.</i>	o			18,75				1,2
<i>Halesus spec.</i>	o			3,13				
<i>Halesus rubricollis</i>	o			0,78				0,8
<i>Hydropsyche angustipennis</i>	x		x	6,25	0,78		1x	2,3
<i>Hydropsyche siltalai</i>	x							1,8
<i>Hydropsyche spec.</i>	x		x					
<i>Limnephilus flavicornis</i>	x							1,8
<i>Limnephilus lunatus</i>	x	x		3,13	3,9			2,0
<i>Limnephilus extricatus</i>	o			0,78				2,2
<i>Limnephelidae</i>	x	x	x					
<i>Limnephilus spec.</i>	x							
<i>Mystacides longicornis</i>	x							2,1
<i>Neureclipsis bimaculata</i>	x							2,1
<i>Oecetis lacustris</i>	x							2,3
<i>Sericostoma personatum</i>	o			0,78				1,0
<i>Diptera</i>								
<i>Chironomidae</i>	x	x		3,91	6,25		1x	
<i>Chironomus plumosus-Gr.</i>	x	x						3,4
<i>Chironomus thummi-Gr.</i>	x	x						3,2
<i>Chironomus spec.</i>	x							

Zeichenerklärung: x = gefunden o = nicht gefunden

EHLE	Landesamt für Umwelt- schutz Sachsen-Anhalt 1996			eigene Untersuchung 2002				S-Index
	gesamt	02	04	02 Individuen pro m ²	04 Individuen pro m ²	Stein 02 Anzahl an Individuen	Stein 04 Anzahl an Individuen	
<i>Culicidae</i>	x							
<i>Odagmia ornata-Gr.</i>	x							2,0
<i>Ptychoptera sp.</i>	x							
<i>Rheotanytarsus spec.</i>	x							
<i>Simuliidae</i>	x	x			2,34			
<i>Tabanidae</i>	x							
<i>Tanipodinae</i>	x	x		0,78				
<i>Tipulidae</i>	x							
<i>Limoniidae</i>	o			3,91	3,91			
<i>Bivalvia</i>								
<i>Anodonta anatina</i>	x							
<i>Anodonta cygnea</i>	x							2,0
<i>Dreissena polymorpha</i>	x							2,2
<i>Pisidium spec.</i>	x				1,56			
<i>Sphaerium corneum</i>	x	x	x	0,78				2,3
<i>Sphaerium rivicola</i>	x							2,2
<i>Sphaerium sp.</i>	x							
<i>Unio tumidus</i>	x							2,0
<i>Unio sp.</i>	x							
<i>Gastropoda</i>								
<i>Acroloxus lacustris</i>	x	x						2,2
<i>Ancylus fluviatilis</i>	x							2,0
<i>Anisus vortex</i>	x							
<i>Bathyomphalus contortus</i>	x	x						2,2
<i>Bithynia tentaculata</i>	x		x	1,56	1,56		1x	2,3
<i>Ferrissia wautieri</i>	x			x		1x		
<i>Gyraulus albus</i>	x							2,1
<i>Lymnaea palustris</i>	x		x					
<i>Lymnaea stagnalis</i>	x							
<i>Physa fontinalis</i>	x							2,4
<i>Planorbarius corneus</i>	x	x						
<i>Planorbis planorbis</i>	x		x					
<i>Potamopyrgus jenkinsi</i>	x		x	0,78				2,3
<i>Radix auricularia</i>	x							
<i>Radix ovata</i>	x	x						2,3
<i>Radix sp.</i>	x	x	x					
<i>Stagnicola corvus</i>	x							
<i>Valvata piscinalis</i>	x							2,1
<i>Viviparus contectus</i>	x							
<i>Viviparus viviparus</i>	x							2,0
<i>Hirundinea</i>								
<i>Erpobdella nigricollis</i>	x							
<i>Erpobdella octoculata</i>	x	x	x	2,34	7,03	3x	1x	2,7
<i>Glossiphonia complanata</i>	x	x	x	x	2,34	1x	1x	2,2
<i>Glossiphonia heteroclita</i>	x				x		1x	2,5
<i>Haementaria costata</i>	x							2,2
<i>Helobdella stagnalis</i>	x	x						2,6

Zeichenerklärung: x = gefunden o = nicht gefunden

EHLE	Landesamt für Umwelt- schutz Sachsen-Anhalt 1996			eigene Untersuchung 2002				S-Index
	gesamt	02	04	02 Individuen pro m ²	04 Individuen pro m ²	Stein 02 Anzahl an Individuen	Stein 04 Anzahl an Individuen	
<i>Hemiclepsis marginata</i>	x							
<i>Piscicola geometra</i>	x							2,6
<i>Theromyzon tessulatum</i>	x	x						
Crustacea								
<i>Asellus aquaticus</i>	x	x	x	7,81	3,13	10x	2x	2,7
<i>Gammarus pulex</i>	x	x	x	118	207	3x	12x	2,1
<i>Gammarus roeseli</i>	x							2,0
<i>Proasellus coxalis</i>	o			3,91	x		1x	2,8
Odonata								
<i>Calopteryx splendens</i>	x		x		2,34			2,0
<i>Coenagrion spec.</i>	x							
<i>Ischnura elegans</i>	x							
<i>Kleinlibellen</i>	x							
<i>Platycnemis pennipes</i>	x							2,1
Oligochaeta								
<i>Eiseniella tetraedra</i>	x							
<i>Limnodrilus spp.</i>	x	x		3,91	0,78			3,3
<i>Lumbriculus variegatus</i>	x							3,0
<i>Tubifex spec.</i>	x							3,5
Zeichenerklärung: x = gefunden o = nicht gefunden								

Der Großteil der vom Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt gefundenen *Ephemeroptera*-Arten wurde im unteren Mittellauf sowie im Unterlauf der Ehle gefunden. *Ephemera danica* wurde an beiden Probenahmestellen 2002 in sehr hohen Abundanzen gefunden, während sie 1996 nur an zwei Stellen in der gesamten Ehle nachgewiesen wurde. *Ephemera danica* bewohnt vor allem saubere Fließgewässer, was sich auch in ihren Saprobienindex von 1,8 widerspiegelt. *Baetis rhodani* eine strömungsliebende Fließgewässerart konnte an der ersten Probenahmestelle nicht mehr nachgewiesen werden. Vom Ernährungstyp wird sie in die Kategorie der Weidegänger eingeordnet, welche sich vor allem von epilithischen Algen bzw. Biofilmen auf Steinen und anderen Hartsubstraten ernähren. So wurde sie an der zweiten Untersuchungsstelle vor allem auf den Biofilmprobenträgern gefunden.

Ein Großteil der *Trichoptera* –Arten wurde 1996 ebenfalls im unteren Mittellauf sowie im Unterlauf der Ehle gefunden, jedoch hat sich 2002 die Anzahl an *Trichoptera* –Arten an beiden Probenahmestellen erheblich erhöht. Außerdem wurden 5 Arten nachgewiesen, die 1996 in keinem Abschnitt der Ehle gefunden wurden. Extrem hohe Abundanzen wurden 2002 bei *Anabolia nervosa* festgestellt, welche als Zerkleinerer sowie als Weidegänger eingeordnet wird und einen Saprobienindex von 2,0 besitzt. Köcherfliegenlarven wurden sehr häufig bei Probenahmen auf den Biofilmprobenträgern gefunden.

Diptera –Arten wurden 1996 in mittleren Ehleabschnitt fast gar nicht gefunden. Bei den Untersuchungen 2002 wurden insgesamt 4 verschiedene Arten festgestellt. Die Dipteren-Larven wurden zwar nur in geringen Abundanzen gefunden, jedoch wurde in fast allen untersuchten Proben mindestens eine Art nachgewiesen. Nach *Chironomidae* –Larven wurden

häufig *Limoniidae* -Larven bestimmt, welche 1996 in der gesamten Ehle nicht festgestellt wurden.

Die größte Anzahl der *Bivalvia* –Arten wurde 1996 ausschließlich im unteren Bereich der Ehle gefunden. Einzig *Sphaerium corneum* war nahezu durchgängig vertreten und wurde auch 2002 an den Untersuchungsstandorten wieder gefunden.

Bei den *Gastropoda* wurde 1996 eine hohe Artenanzahl in der Ehle festgestellt. Bei den Untersuchungen 2002 wurden insgesamt nur 3 Arten nachgewiesen, diese geringe Anzahl kann jedoch darauf zurückzuführen sein, dass Makrophytenbestände nicht in die Untersuchung einbezogen wurden.

Bei den Tiergruppen *Hirundinea*, *Crustacea*, *Odonata* und *Oligochaeta* gab es nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsjahren. Wobei erwähnt werden muss, dass die Rote Liste Art *Calopteryx splendens* auch 2002 wieder nachgewiesen wurde. Der Kleinkrebs *Gammarus pulex* war an beiden Untersuchungsstandorten die Art mit der höchsten Abundanz. Teilweise war es nicht möglich die tatsächliche Anzahl aller Tiere pro Probe (über 200) zu bestimmen. Bei den *Oligochaeta* war an den Untersuchungsstandorten 2002 nur eine Art vertreten.

3.2 Mikroskopie und Bildanalyse

3.2.1 CLSM

Mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie können dünne und lockere Biofilme sehr gut mikroskopiert werden. Probleme traten jedoch bei dicken kompakten Biofilmen auf. **Abb. 3-3** zeigt zwei Beispiel-Bilder von Ehle-Biofilmen vom März bzw. April 2000, welche mit dem 20x Objektiv aufgenommen wurden. Die drei-dimensionale Darstellung zeigt deutlich, dass nur die oberste Schicht des Biofilms (ca. 100 μm) detektiert wurde. Von tiefer gelegenen Schichten sind kaum Signale vorhanden.

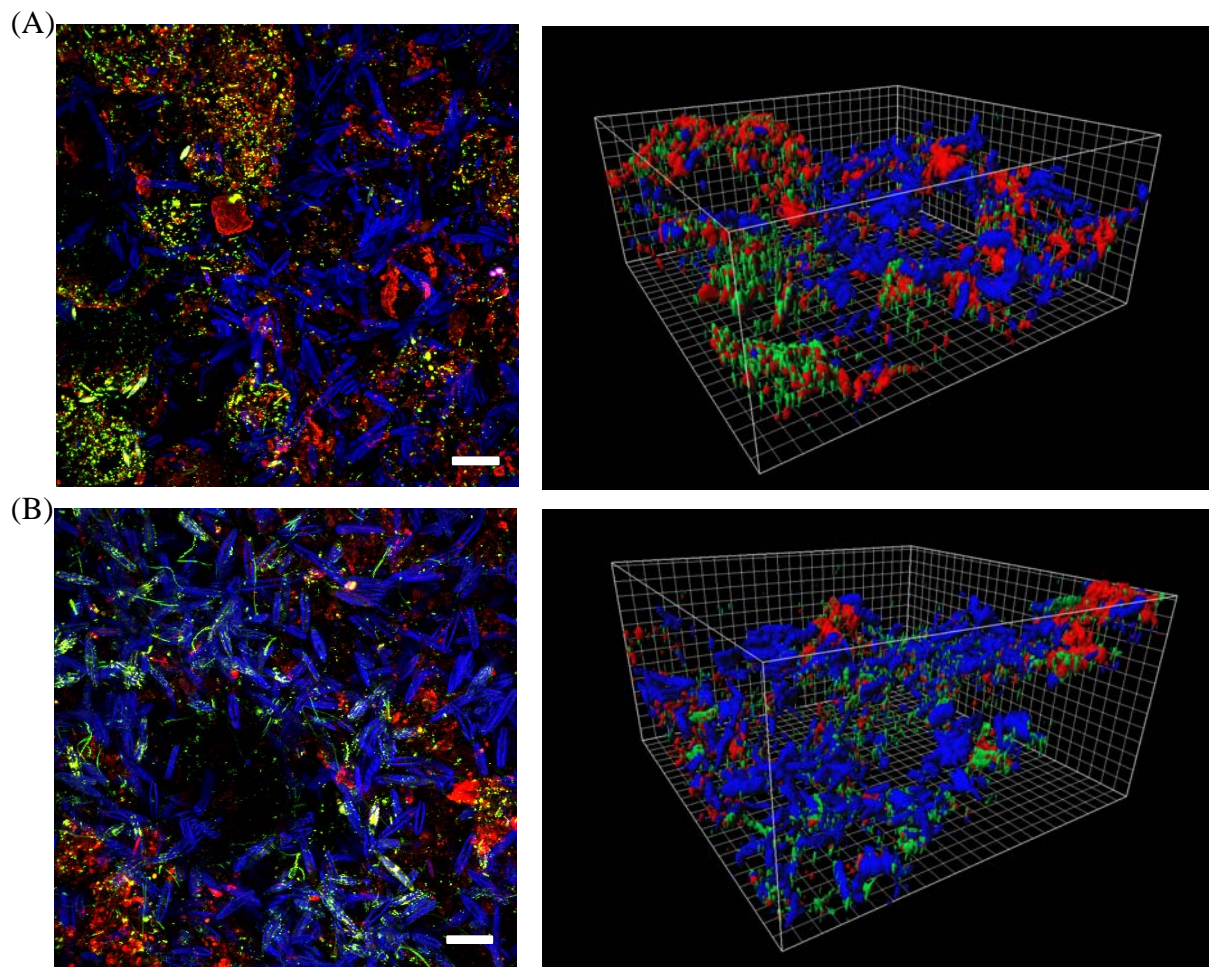


Abb. 3-3 Maximum Intensität Projektionen und drei-dimensionale Darstellungen (erstellt in Imaris 3) von kompakten Ehle-Biofilmen; (A) Biofilmprobe: Ehle 12 vom März 2001, Biofilmdicke: 215 μm ; (B) Biofilmprobe: Ehle 02 vom April 2001, Biofilmdicke: 265 μm ; Farbliche Zuordnung: Bakterien-grün, Glykokonjugate-rot, Algen-blau, Cyanobakterien-pink; (Kantenlänge entspricht 500 μm , Balken entspricht 50 μm)

Von diesen Biofilmproben wurden aus diesem Grund xz-Querschnitte mit Hilfe eines Kryotoms angefertigt. Hier konnten jedoch nur die photoautotrophen Mikroorganismen und die Bakterien aufgenommen werden, da eine Färbung der Glykokonjugate nach der Einbettung nicht mehr möglich war. Die xz-Schnitte (**Abb. 3-4**) zeigen die kompletten Querschnitte der oben dargestellten Biofilmproben und geben die tatsächliche Struktur und Dicke des Biofilms wider. Diese Querschnitte machen deutlich, dass bei solch dicken und

kompakten Biofilmen nur ein sehr geringer Teil bei den regelmäßigen Untersuchungen detektiert wurde. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass bei dicken Biofilmen (von Dezember bis April) die detektierten Biovolumen sowie die bestimmten Biofilmdicken stark unterschätzt wurden.

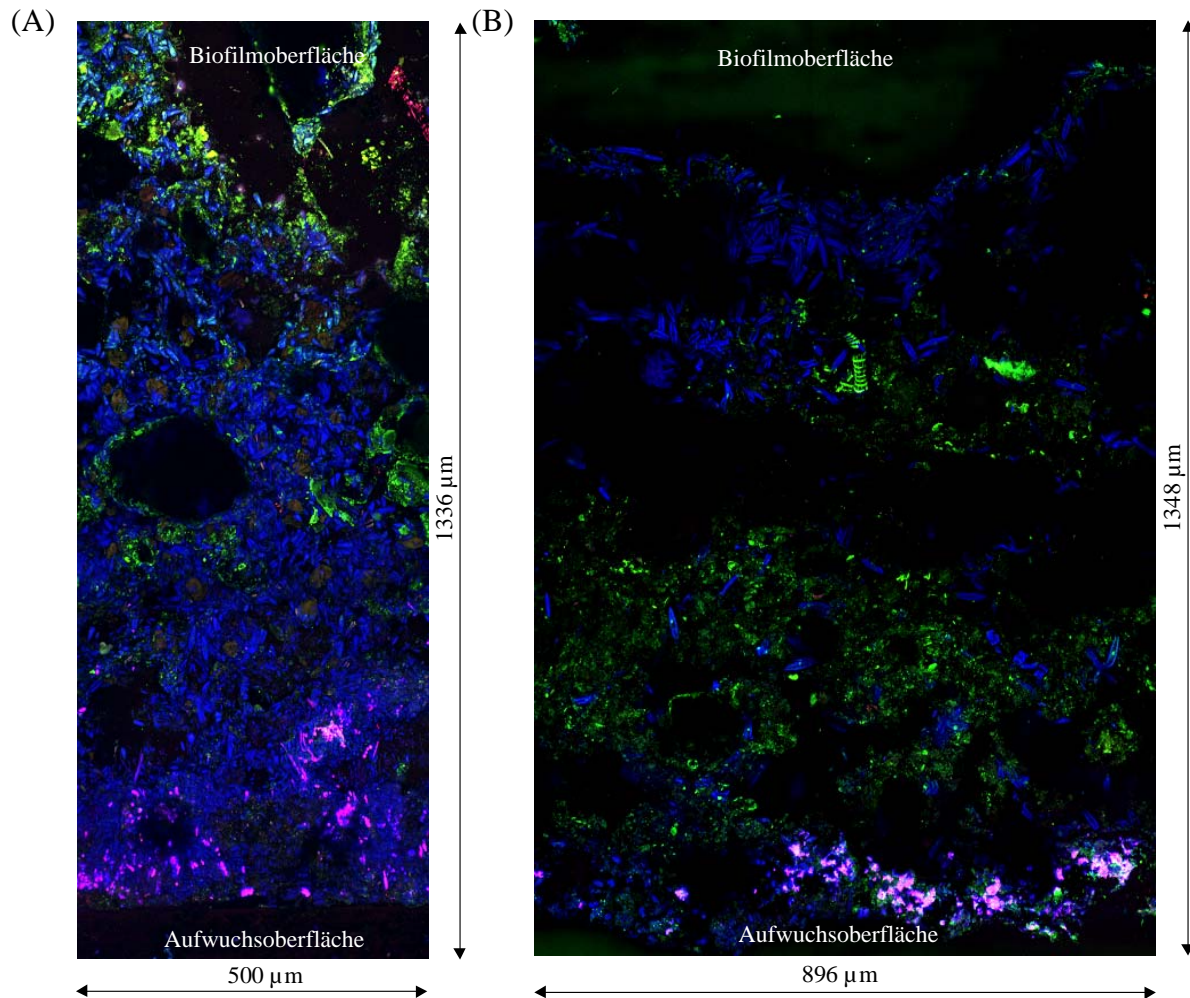


Abb. 3-4 Maximum Intensität Projektionen von xz-Querschnitten der in Abb. 3-3 dargestellten Biofilmpuben; (A) Biofilmprobe: Ehle 12 vom März 2001, (B) Biofilmprobe: Ehle 02 vom April 2001; Farbliche Zuordnung: Bakterien-grün, Algen-blau, Cyanobakterien-pink;

3.2.2 Bildanalyse

3.2.2.1 Vergleich von Bildanalyseprogrammen

Für den Vergleich der zur Verfügung stehenden Quantifizierungsprogramme wurden 4 Bilder ausgewählt, die sehr unterschiedliche Biofilmmzusammensetzungen ausweisen (**Abb. 3-5**). An diesen Beispieldatensätzen sollen die Probleme bei der Bildanalyse gezeigt werden.

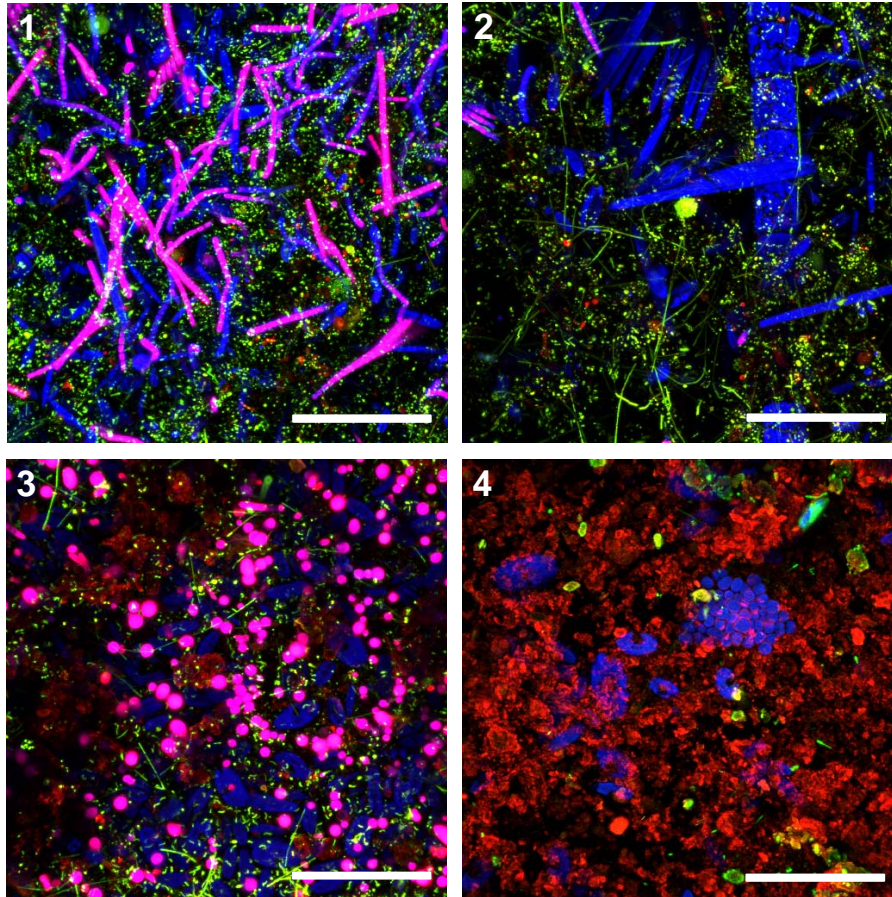


Abb. 3-5 Beispieldatensätze (Bild 1-4) für den Vergleich der Quantifizierungsprogramme. Maximum Intensität Projektionen der CLSM-Biofilmbilder: Bakterien (grün), Glykokonjugate (rot), Algen (blau) und Cyanobakterien (pink), Balken entspricht 50 µm.

Gesamtvolumen der detektierten Objekte

Der Vergleich der quantitativen Ergebnisse der untersuchten Programme ist in **Abb. 3-6** dargestellt. Bei der Quantifizierung mit Scion Image, Voxelshop Pro und Comstat wurde ein Schwellenwert von 50 verwendet (Pixelintensitäten im Bild zwischen 0 und 255). Mit diesem Schwellenwert wurde die beste Segmentierung erzielt (visuelle Beurteilung). Die Ergebnisse der Bakterien-, Glykokonjugat- und Algenvolumen (**Abb. 3-6 A, B, C**) zeigen fast identische Werte. Das Programm Microstat quantifiziert im Gegensatz zu den anderen Programmen mit Hilfe einer Wasserscheidensegmentierung und mehreren Schwellenwerten. Der untere Schwellenwert (vergleichbar mit denen der anderen Programme) liegt mit nur 20 wesentlich tiefer. Der obere Schwellenwert wurde auf 70 gesetzt, zur Vergleichbarkeit wurden hier die Cyanobakterien nicht selektiert (**Abb. 3-6 A, B, C**). Mit dieser Schwellenwertkombination wurden vergleichbare Ergebnisse mit denen der anderen Programme erzielt. Auffällig ist, dass die errechneten Volumina bei Microstat manchmal etwas größer und manchmal etwas kleiner gegenüber den anderen sind. Dies liegt am Segmentierungsalgorithmus. Durch den unteren

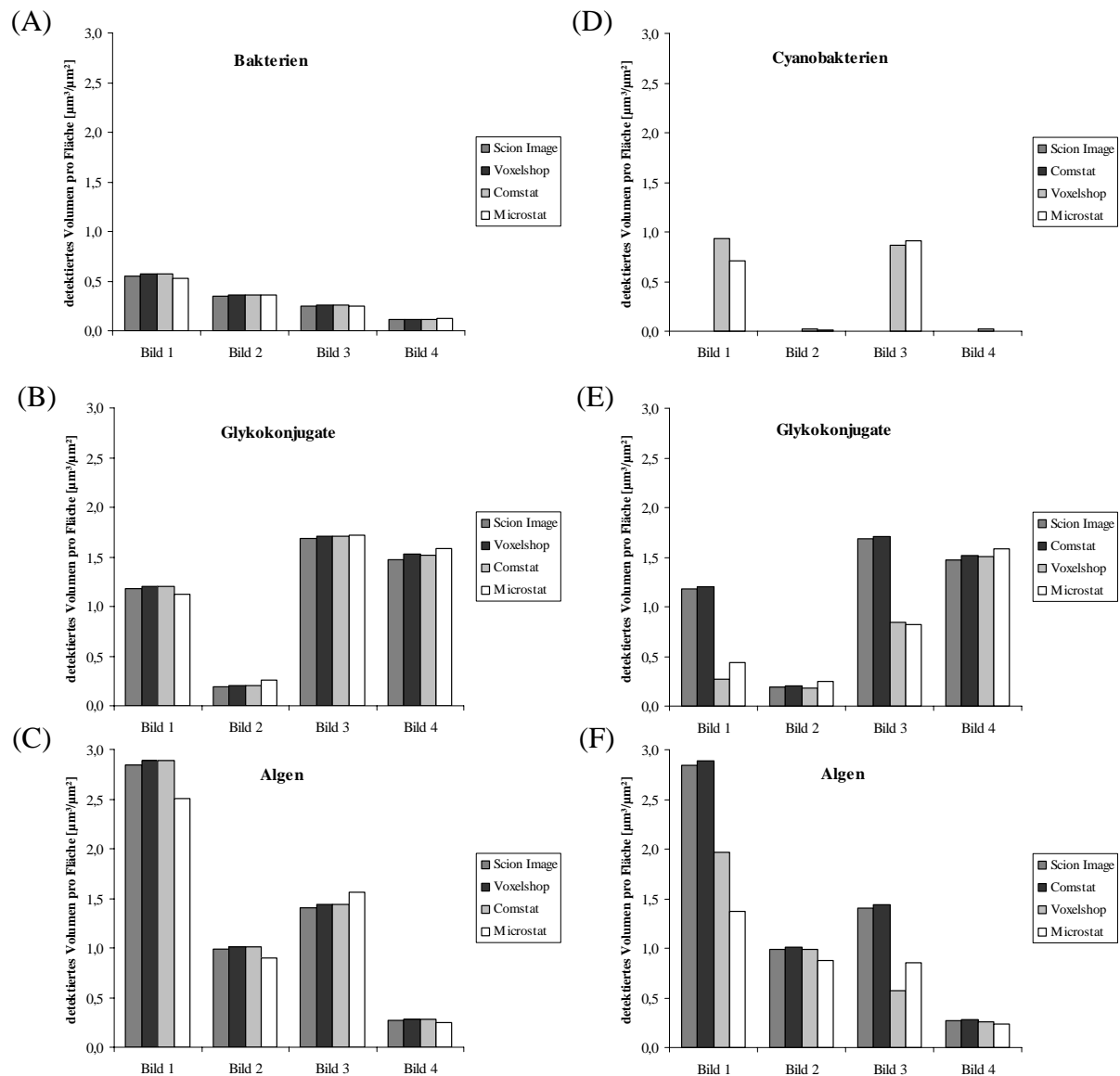


Abb. 3-6 Vergleich der quantitativen Auswertung der Beispieldatensätze (Abb. 3-5) mit den Programmen Scion Image, Voxelshop, Comstat und Microstat.

Abb. 3-5A,B,C Darstellung der ermittelten Bakterienvolumen (A), Volumen der Glykokongjugate (B) und Algenvolumen (C). Die Quantifizierung erfolgte bei allen 4 Programmen ohne Berechnung der Cyanobakterien.

Abb. 3-5D,E,F Darstellung der berechneten Cyanobakterien-Volumen (D), Volumen der Glykokongjugate (E) und Algen-Volumen (F). Die Quantifizierung erfolgte bei den Programmen Voxelshop Pro/Colocalisation und Microstat unter Berücksichtigung der Cyanobakterien und Verrechnung bei der Bestimmung der Volumen von Glykokongjugaten und Algen.

Schwellenwert von nur 20 werden auch Pixel mit geringeren Intensitäten als Objekte erkannt. Entscheidend ist, dass mindestens ein Pixel im Objekt eine Intensität über dem oberen Schwellenwert von 70 besitzt. Dadurch kann das Programm besser zwischen Objekt und Hintergrundrauschen entscheiden. Somit sind die gefundenen Objekte oft wesentlich größer als bei den anderen Programmen.

Stark angeregte Objekte fluoreszieren oft über ihren Rand hinaus und erscheinen so viel größer als sie tatsächlich sind. Aus diesem Grund ist in den Algorithmus vom Microstat eine Funktion integriert worden, die solche übermäßige Fluoreszenz reduziert. Hiervon sind Pixel

am Rand von Objekten betroffen, die eine Intensität unter einem festgesetzten Verhältnis zur Maximalintensität besitzen. Durch diese zwei Funktionen in Microstat können die Unterschiede in den Ergebnissen erklärt werden. Sie führen zu einer Erhöhung des tatsächlichen Objektvolumens und zu einer Verringerung des Anteils an Rauschen bzw. von Streustrahlung. Wird für beide Schwellenwerte ein Wert von 50 angenommen und die Funktion zur Verminderung von Streustrahlung ausgeschaltet, werden identische Ergebnisse zu denen der anderen Programme erzielt.

Probleme treten jedoch bei Anwesenheit von Cyanobakterien auf. Die Cyanobakterien werden durch die Laserlinien stark angeregt. Das Phycocyanin und das Phycoerythrin der Cyanobakterien geben ein starkes Fluoreszenzsignal im 2. Kanal. Das Chlorophyll a hingegen fluoresziert im 3. Kanal. In den Maximum Intensität Projektionen sind die Cyanobakterien durch die Überlagerung der roten und blauen Signale als pinke Objekte zu erkennen. In den Ergebnissen der Quantifizierung bewirkt das Vorhandensein von Cyanobakterien eine Verfälschung der ermittelten Volumina von Glykokonjugaten und Algen (Bild 1 und Bild 3, **Abb. 3-6**). Da Scion Image, Voxelshop Pro und Comstat jeden Kanal separat analysieren, können Cyanobakterien nicht erkannt werden. Für Voxelshop Pro gibt es jedoch das zusätzliche Programm Colocalisation. Dieses Programm sucht nach Kolokalisationen zwischen ausgewählten Kanälen. Durch eine Kolokalisation des 2. und 3. Kanals ist es mit diesem Programm möglich die Cyanobakterien zu erfassen und sie später von den Glykokonjugaten und Algen abziehen. Der Segmentierungsalgorithmus von Microstat hingegen beinhaltet schon eine Kolokalisation zwischen dem 2. und 3. Kanal. Die einzelnen kolokalisierenden Segmente werden markiert, von den beiden ursprünglichen Kanälen separiert und in einem zusätzlichen Kanal dargestellt. Dadurch werden die Cyanobakterien automatisch aus den 2. und 3. Kanal entfernt und alle Biofilmbestandteile werden so korrekt quantifiziert. Die **Abb. 3-6 D, E, F** zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung mit einer Bestimmung der Cyanobakterien. Mit den Programmen Scion Image und Comstat können die Cyanobakterien nicht berechnet werden. Durch die Bestimmung der Cyanobakterien bei Voxelshop Pro/Colocalisation und Microstat ändern sich auch die Volumen der Glykokonjugate und Algen. Dies führt bei den Bildern 1 und 3 aus **Abb. 3-5** zu erheblichen Unterschieden in den Ergebnissen der Quantifizierung der Glykokonjugate und Algen zwischen den Programmen (**Abb. 3-6 E, F**). Da während der Sommermonate Cyanobakterien verstärkt auftreten, eignen sich die Programme Scion Image und Comstat nicht für die Auswertung der Bilddaten von den durchgeführten Experimenten.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Entscheidung für ein Programm ist der Zeitaufwand und die Handhabung. Die Programme Scion Image, Comstat und Microstat lassen sich vollkommen automatisieren. Bei umfangreichen Experimenten ist dies zwingend erforderlich, da eine manuelle Bearbeitung der anfallenden Datenmengen zeitlich nicht möglich ist. Bei Voxelshop Pro/Colocalisation muss jeder Bildstapel separat vom Benutzer bearbeitet werden, dies kann pro CLSM-Bildstapel ca. 30 min dauern.

Das Programm Microstat eignete sich somit am besten für die Quantifizierung der CLSM-Bildstapel in diesen Versuchen. Die Berechnungen der Bilddaten wurden aus diesem Grund stets mit Microstat durchgeführt.

3.2.3 Einfluss der Schwellenwerte

Der entscheidende Schritt bei einer quantitativen Auswertung mit Hilfe von Analyseprogrammen ist die Entscheidung über die Schwellenwerte, wodurch das Programm zwischen Objektinformation und Hintergrund entscheiden kann. Zu Beginn der Auswertung muss deshalb entschieden werden, welche die optimalen Schwellenwerte für die Segmentierung der zu untersuchenden Bilder sind.

Dafür wurden zwei charakteristische Bilder ausgesucht (**Abb. 3-7**). Bild A weist einen hohen Anteil an Glykokonjugaten auf. In diesem Biofilm sind keine Cyanobakterien vorhanden. Bild B besitzt dagegen nur sehr wenige Glykokonjugate, jedoch eine hohe Konzentration von Cyanobakterien und Algen.

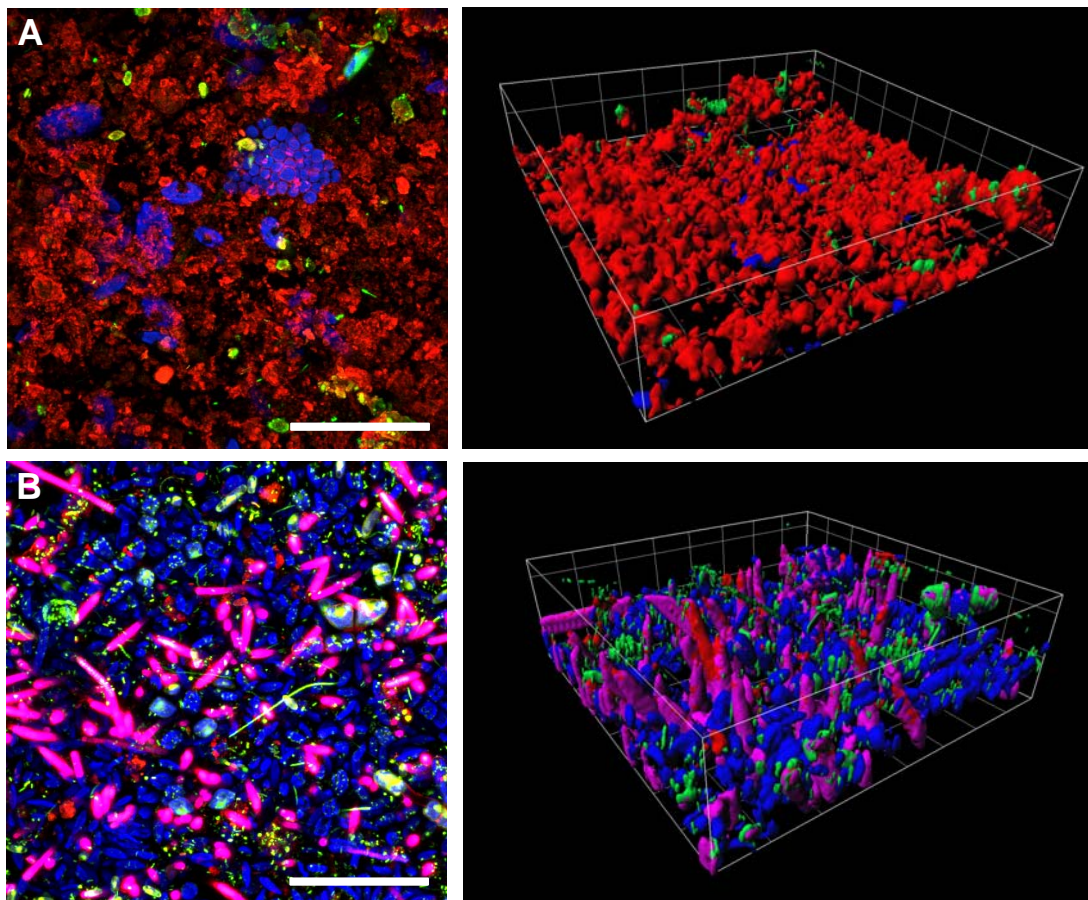


Abb. 3-7 Maximum Intensität Projektionen und drei-dimensionale Darstellung (erstellt in Imaris 3) von zwei für die Einstellung der Schwellenwerte ausgewählten Ehle-Biofilmbildern; Farbliche Zuordnung: Bakterien-grün, Glykokonjugate-rot, Algen-blau, Cyanobakterien-pink; Balken entspricht 50 μm

Der Einfluss eines Schwellenwertes auf die Volumenergebnisse ist bei Bildanalyseprogrammen sehr hoch. Bei dem verwendeten Bildanalyseprogramm Microstat wurde mit Hilfe eines Wasserscheidenalgorithmus und der Integrierung verschiedener Schwellenwerte erreicht, diesen starken Einfluss zu minimieren und so eine bessere Analyse zu gewährleisten. Außerdem werden Hintergrundrauschen sowie Streusignale herausgefiltert. Der Einfluss des unteren und oberen Schwellenwertes auf die Volumenergebnisse der ausgewählten Bilder (**Abb. 3-7**) wurde im relevanten Bereich dargestellt (**Abb. 3-8 und Abb. 3-9**). Der untere Schwellenwert (1.Schwellenwert) wurde im Intensitätsbereich von 10 bis 40 variiert. Pixel unterhalb dieses Schwellenwertes gehen nicht in die Analyse ein. Die minimale

Intensität für einen Saatpunkt (2.Schwellenwert) wurde von 40 bis 100 variiert. Für die Objektanalyse heißt dies, dass es in einem gefundenen Objekt mindestens einen Pixel mit einer Intensität über dem 2. Schwellenwert geben muss.

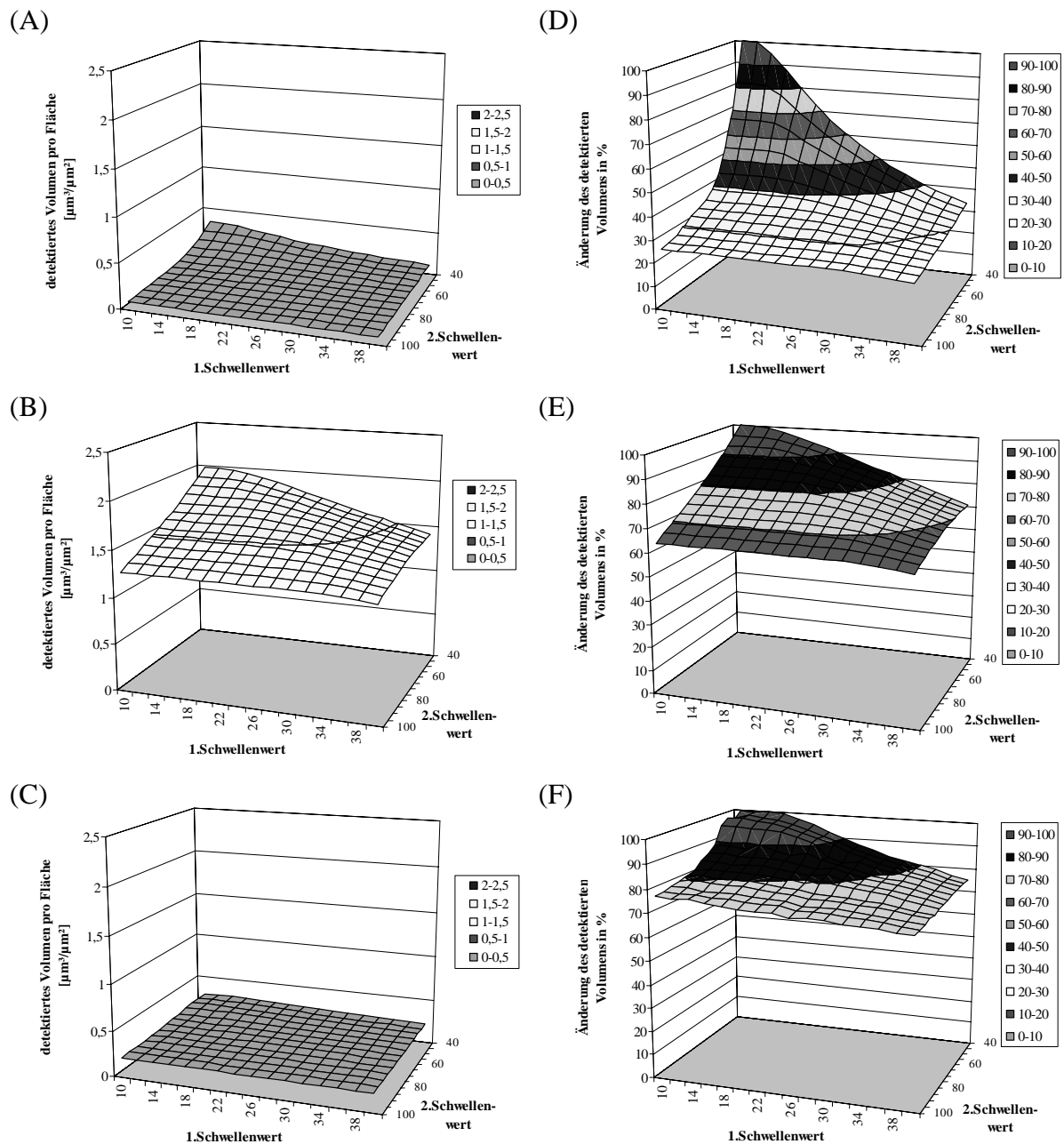


Abb. 3-8 Änderung des detektierten Biovolumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$] der (A) Bakterien, (B) Glykokonjugate und (C) Algen in Abhängigkeit vom 1. und 2. Schwellenwert bzw. die Biovolumenänderung in % (D, E, F) wobei das Biovolumen bei der niedrigsten Schwellenwertkombination 100 % ist (für Bild A, Abb. 3-7)

Vor allem bei den Bakterien in Bild A (**Abb. 3-7**) zeigte sich ein deutlicher Einfluss der beiden Schwellenwerte im niedrigen Bereich (**Abb. 3-8**). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um die Reduzierung von Störsignalen bzw. Rauschen, da vor allem sehr kleine Objekte mit geringen Intensitäten entfernt werden. Durch Erhöhung der Schwellenwerte sinkt als erstes die Anzahl der gefundenen Objekte erheblich ab, z.B. sinkt die Anzahl der Bakterien von 1187 bei einer Kombination der beiden Schwellenwerte von 10 und 40 auf nur

412 bei einer Kombination von 20 und 70 (**Tabelle 3-8**). Um dieses Rauschen erfolgreich heraus zu filtern, darf die Schwellenwertkombination deshalb nicht zu niedrig gesetzt werden. Bei den Glykokonjugaten und Algen ist dieser Einfluss der Schwellenwerte in diesem Bereich wesentlich geringer.

Tabelle 3-8 Darstellung der Anzahl der gefundenen Objekte, ihrer Größe und Intensität in Abhängigkeit von der Schwellenwertkombination von Bild A aus Abb. 3-7.

Schwellenwert 1. und 2.	Bakterien			Glykokonjugate		
	10-40	20-70	40-100	10-40	20-70	40-100
Anzahl der Objekte	1187	412	274	6093	4405	3160
Volumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]	0,34	0,12	0,09	1,98	1,59	1,22
avg Volumen/Objekt	7,18	7,38	7,86	8,15	9,03	9,71
avg Intensität der Objekte	42	77	96	62	75	88

Schwellenwert 1. und 2.	Algen			Cyanobakterien		
	10-40	20-70	40-100	10-40	20-70	40-100
Anzahl der Objekte	134	99	89	5	10	32
Volumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]	0,28	0,245	0,20	0,00	0,00	0,00
avg Volumen/Objekt	53,48	59,89	56,68	5,92	5,34	5,44
avg Intensität der Objekte	77	95	107	97	89	85

Auch die Ergebnisse von Bild B (**Abb. 3-7**) zeigen den unterschiedlichen Einfluss der Schwellenwerterhöhung auf die einzelnen Biofilmbestandteile (**Abb. 3-9 und Tabelle 3-9**). Beide untersuchten Bilder zeigen in dieser Hinsicht große Unterschiede. Das Volumen der Bakterien in Bild B nimmt mit zunehmender Schwellenwertkombination nur um ca. 40 % ab gegenüber einer Abnahme von 80 % in Bild A. Der größte Einfluss in Bild B hat die Schwellenwerterhöhung auf die Glykokonjugate. Hier sinkt das Volumen um 65 % wohingegen in Bild A das Volumen nur um 40 % sank. Auch bei den Algen wurde eine stärkere Abnahme des Volumens in Bild B festgestellt. Auf das Ergebnis der Cyanobakterien scheint eine Schwellenwerterhöhung fast keinen Einfluss zu haben. Für die Bestimmung der Cyanobakterien durch die Kollokalisierung des 2. und 3. Kanals gelten zusätzliche Entscheidungskriterien. Dadurch wird die Volumenberechnung nur unwesentlich von der Schwellenwerterhöhung betroffen (**Abb. 3-9**).

Tabelle 3-9 Darstellung der Anzahl der gefundenen Objekte, ihrer Größe und Intensität in Abhängigkeit von der Schwellenwertkombination von Bild B aus Abb. 3-7.

Schwellenwert 1. und 2.	Bakterien			Glykokonjugate		
	10-40	20-70	40-100	10-40	20-70	40-100
Anzahl der Objekte	3053	2080	1538	3888	2023	1166
Volumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]	0,57	0,45	0,36	0,90	0,55	0,33
avg Volumen/Objekt	4,71	5,38	5,96	5,77	6,73	7,02
avg Intensität der Objekte	75	97	116	52	74	95

Schwellenwert 1. und 2.	Algen			Cyanobakterien		
	10-40	20-70	40-100	10-40	20-70	40-100
Anzahl der Objekte	1577	1134	868	223	259	322
Volumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]	2,38	1,76	1,35	1,57	1,58	1,61
avg Volumen/Objekt	37,96	39,02	39,21	176,82	153,86	125,79
avg Intensität der Objekte	73	91	106	149	142	132

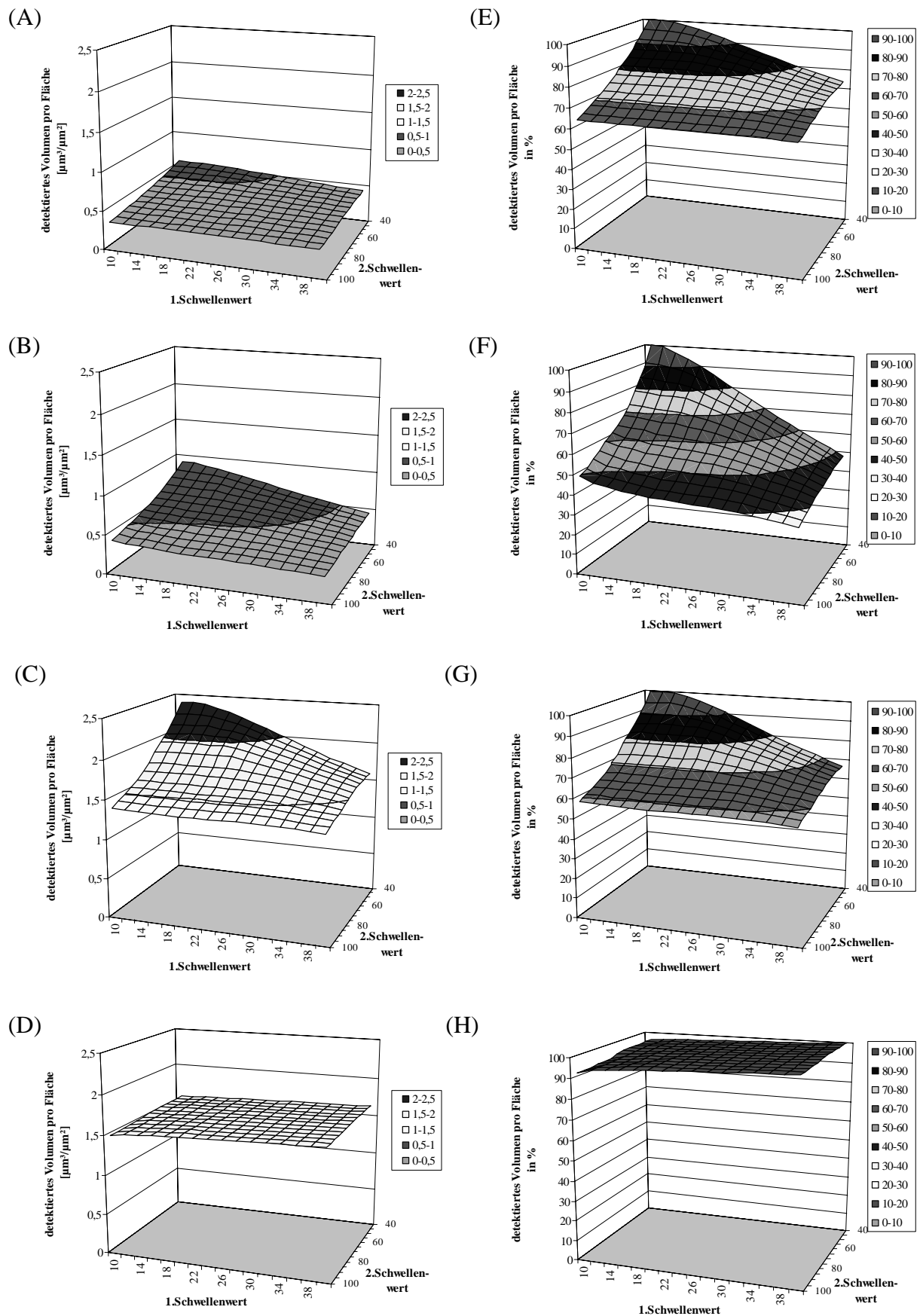


Abb. 3-9 Änderung des detektierten Biovolumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$] der (A) Bakterien, (B) Glykokonjugate, (C) Algen und (D) Cyanobakterien in Abhängigkeit vom 1. und 2. Schwellenwert bzw. die Biovolumenänderung in % (E, F, G, H) wobei das Biovolumen bei der niedrigsten Schwellenwertkombination 100 % ist (für Bild B, Abb. 3-7)

Für die quantitative Auswertung wurde ein unterer Schwellenwert von 20 und ein oberer Schwellenwert von 70 als optimal eingeschätzt. In diesem Bereich haben beide Schwellenwerte einen verhältnismäßig geringen Einfluss auf das Ergebnis. Aus diesem Grund kann für alle Untersuchungen diese Schwellenwertkombination beibehalten werden. Die Ergebnisse mit dieser Schwellenwertkombination sind mit den Ergebnissen anderer Analyseprogramme mit einer Thresholdsegmentation bei einem Schwellenwert von 50 vergleichbar, jedoch nur bei Bildern ohne Cyanobakterien (Bild A). Das Vorhandensein von Cyanobakterien verfälscht bei diesen Programmen die ermittelten Volumen der Glykokojugate sowie der Algen.

3.3 Biofilmuntersuchungen

3.3.1 Vergleich von Biofilmen gewachsen auf natürliche und künstlichen Substraten

Von den beiden Untersuchungsstandorten an der Ehle wurden zu verschiedenen Jahreszeiten Biofilme auf Steinen und auf den Polykarbonatprobenträgern mikroskopiert. Diese Untersuchungen dienten der Kontrolle, ob auf den Probenträgern vergleichbare Biofilme aufwachsen wie auf natürlichen im Fließgewässer schon vorhandenen Substraten. Die mikroskopischen Untersuchungen (**Abb. 3-10**) zeigten eine vergleichbare Biofilmstruktur und Biofilmzusammensetzung auf den Steinen wie auf den Polykarbonatprobenträgern. Eine jahreszeitlich bedingte Veränderung der Struktur und Zusammensetzung der Biofilme war stets auf beiden Substraten zu beobachten.

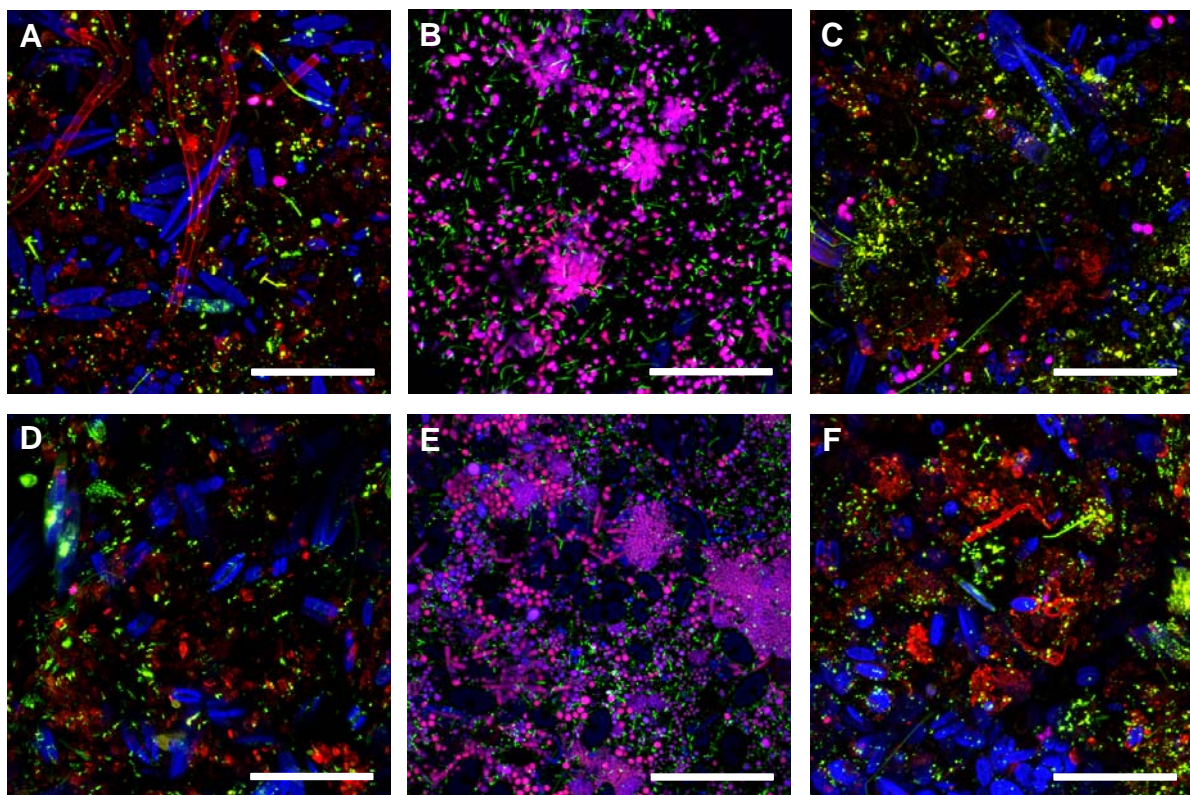


Abb. 3-10 Vergleich der Struktur von Biofilmen gewachsen auf Steinen (A, B, C) bzw. Polykarbonatobjekträgern (D, E, F); Maximum Intensität Projektion der CLSM-Biofilmbilder im Frühjahr (A, D), Sommer (B, E) und Herbst (C, F); Farbliche Zuordnung: Bakterien-grün, Glykokonjugate-rot, Algen-blau, Cyanobakterien-pink; Balken entspricht 50 μm

3.3.2 Jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms

Die erste Versuchsreihe startete Anfang April 2000 mit dem Ausbringen der Aufwuchsträger an den Standorten Ehle 02 und Ehle 04. Der benthische Biofilm des Fließgewässers Ehle zeichnete sich durch eine hohe Vielfalt an Bakterien, Cyanobakterien und Algen aus. Besonders während der Anfangsbesiedlung konnten Bakterien unterschiedlicher morphologischer Typen beobachtet werden (**Abb. 3-11**). Die Bakterien waren fast immer assoziiert mit Glykokonjugaten, bildeten Gallertschichten (**Abb. 3-11 C**) oder waren komplett eingebettet in einer von ihnen produzierten Glykokonjugat-Matrix (**Abb. 3-11 D, E**). In dicken komplexen Biofilmen wurden die Bakterien besonders an den Oberflächen von großen Aggregaten sowie an den Oberflächen von Diatomeen beobachtet (**Abb. 3-11 F**), hier profitieren die Bakterien vor allem von den Exudaten der Algen. In großer Anzahl traten sie auch an der Oberfläche absterbender Diatomeen auf. Filamente Bakterien besaßen nur einen geringen Anteil an der Bakterienbiomasse im benthischen Biofilm.

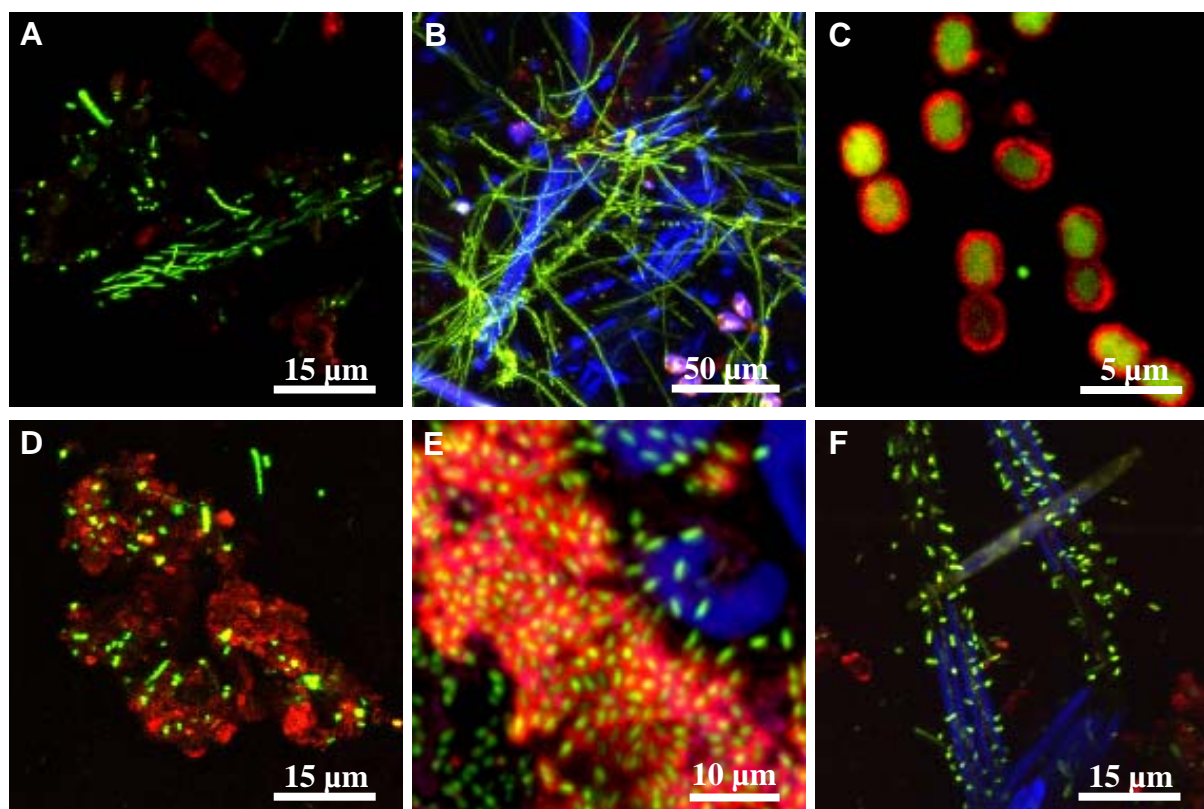


Abb. 3-11 Maximum Intensität Projektionen von CLSM-Bildern, Beispiele für die morphologische Vielfalt von Bakterien (A, B), der Produktion von Glykokonjugaten in Form von Gallertschichten (C) oder einer Glykokonjugatmatrix (D, E), die Besiedlung von Diatomeen (F), Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10

Die Anfangsbesiedlung der Aufwuchsträger erfolgte in einem sehr kurzen Zeitraum. Bereits nach wenigen Tagen hatte sich ein komplexer Biofilm gebildet. Die Entwicklung der Biofilme am Standort Ehle 02 ist in **Abb. 3-12** und am Standort Ehle 04 in **Abb. 3-13** dargestellt. Während dieser Zeit wurde eine hohe Diversität sowie eine große Formenvielfalt an Diatomeen beobachtet. Die hohe Konzentration an Diatomeen führte zu einer hohen Biofilmmakкумуляtion, charakterisiert durch eine starke Zunahme der Bakterien-, Glykokonjugate- sowie Algenbiomasse (**Abb. 3-14**). Die mittlere Biofilmdicke (**Abb. 3-15**) stieg in dieser Zeit auf 324 bzw. 235 µm an. Die Biofilme wiesen eine hohe Heterogenität auf.

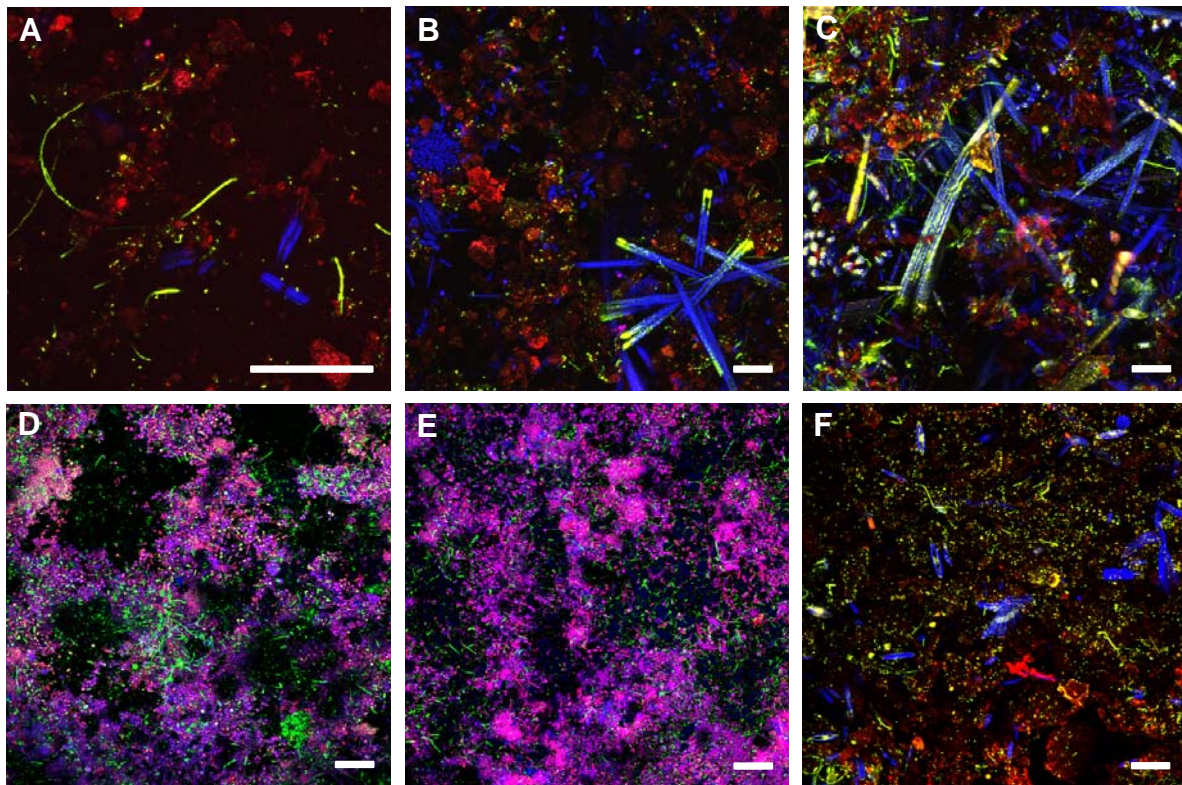


Abb. 3-12 Biofilmentwicklung am Standort Ehle 02, Exposition der Aufwuchsträger 05.04.00 (1.Versuchsreihe), Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 5 Tagen (A), 9 Tagen (B), 2 Wochen (C), 6 Wochen (D), 12 Wochen (E), 40 Wochen (F), Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 μ m

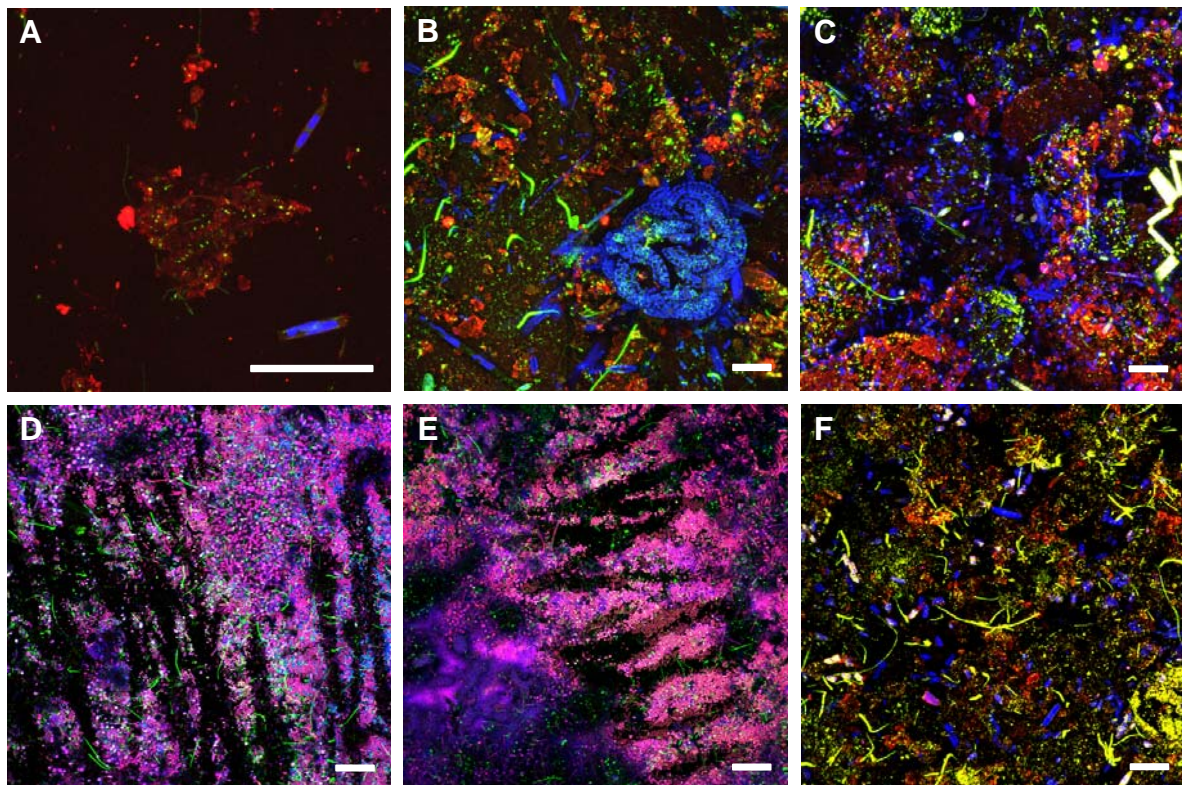


Abb. 3-13 Biofilmentwicklung am Standort Ehle 04, Exposition der Aufwuchsträger 05.04.00 (1.Versuchsreihe), Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 5 Tagen (A), 9 Tagen (B), 2 Wochen (C), 6 Wochen (D), 12 Wochen (E), 40 Wochen (F), Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 μ m

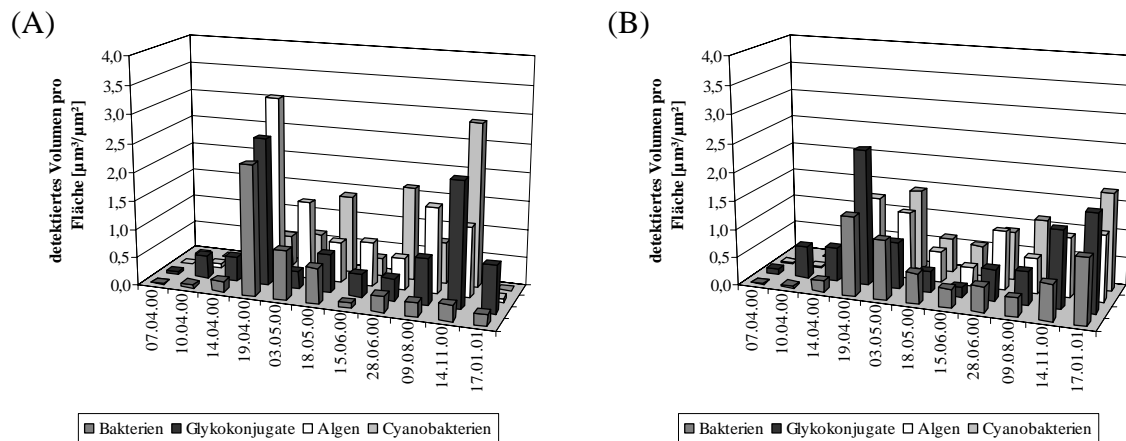


Abb. 3-14 Änderung der detektierten Biovolumen von Bakterien, Glykokonjugaten, Algen und Cyanobakterien während der 1. Versuchsreihe an den Standorten (A) Ehle 02 und (B) Ehle 04

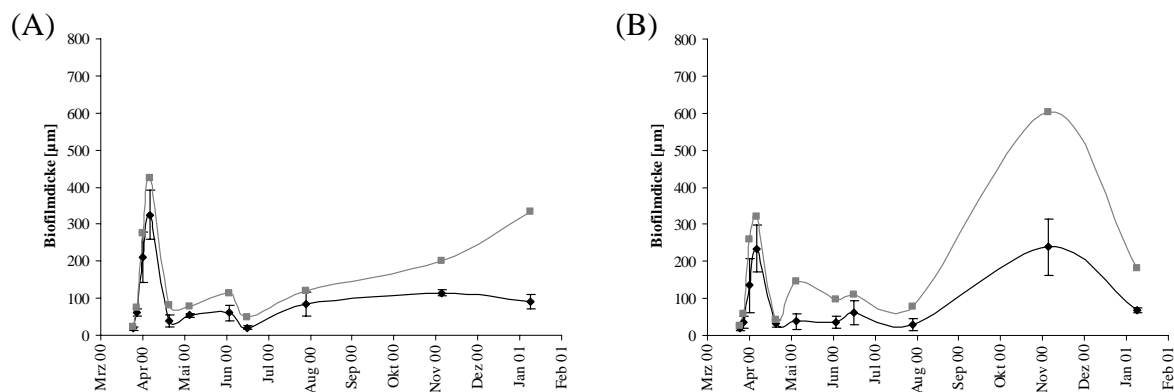


Abb. 3-15 Änderung der mittleren Biofilmdicke (schwarz) und der maximalen Biofilmdicke (grau) während der 1. Versuchsreihe an den Standorten Ehle 02 (A) und Ehle 04 (B)

Große Aggregate mit Bakterien und Glykokonjugaten sowie Diatomeen unterschiedlichster Formen und Größe bildeten komplexe und vielseitige Strukturen (**Abb. 3-16**). Oft bildeten sich lange Diatomeenkette an der Oberfläche des Biofilms (**Abb. 3-16 E, F**). Glykokonjugate wurden sowohl von den Bakterien als auch von den Diatomeen produziert. An der Oberfläche der Diatomeen konnte häufig eine Glykokonjugat-Schicht nachgewiesen werden (**Abb. 3-16 G, H**). Einige Diatomeen bildeten Gallertstiele zur Befestigung im Biofilm aus, die mit dem verwendeten Lektin sehr gut angefärbt werden konnten (**Abb. 3-16 I**).

Nach 4 Wochen sank die Biofilmdicke rapide an beiden Standorten. Die mikroskopischen Aufnahmen sowie die quantitativen Ergebnisse (**Abb. 3-14**) zeigten eine Abnahme des Bakterien-, Glykokonjugat- und Algen-Volumens und eine Zunahme des Volumens an Cyanobakterien. Innerhalb einer Woche verwandelte sich der sehr komplexe stark strukturierte Biofilm in eine dünne Biofilmschicht von wenigen μm Dicke bestehend aus Bakterien und Cyanobakterien (**Abb. 3-12 Bild D und Abb. 3-13 Bild D**). Hierbei handelte es sich vor allem um kugelförmige Cyanobakterien, die fast vollständig die gesamte Aufwuchsoberfläche bedeckten (**Abb. 3-17 A**) oder die Zwischenräume von Diatomeen besiedelten (**Abb. 3-17 C**). Mitunter konnte sich ein Geflecht aus filamentförmigen Cyanobakterien bilden (**Abb. 3-17 B**). Die Diversität der Algen nahm stark ab, es wurden nur noch einzelne kleine ovalförmige Diatomeen (**Abb. 3-17 C**) sowie vereinzelt einige Grünalgen gefunden.

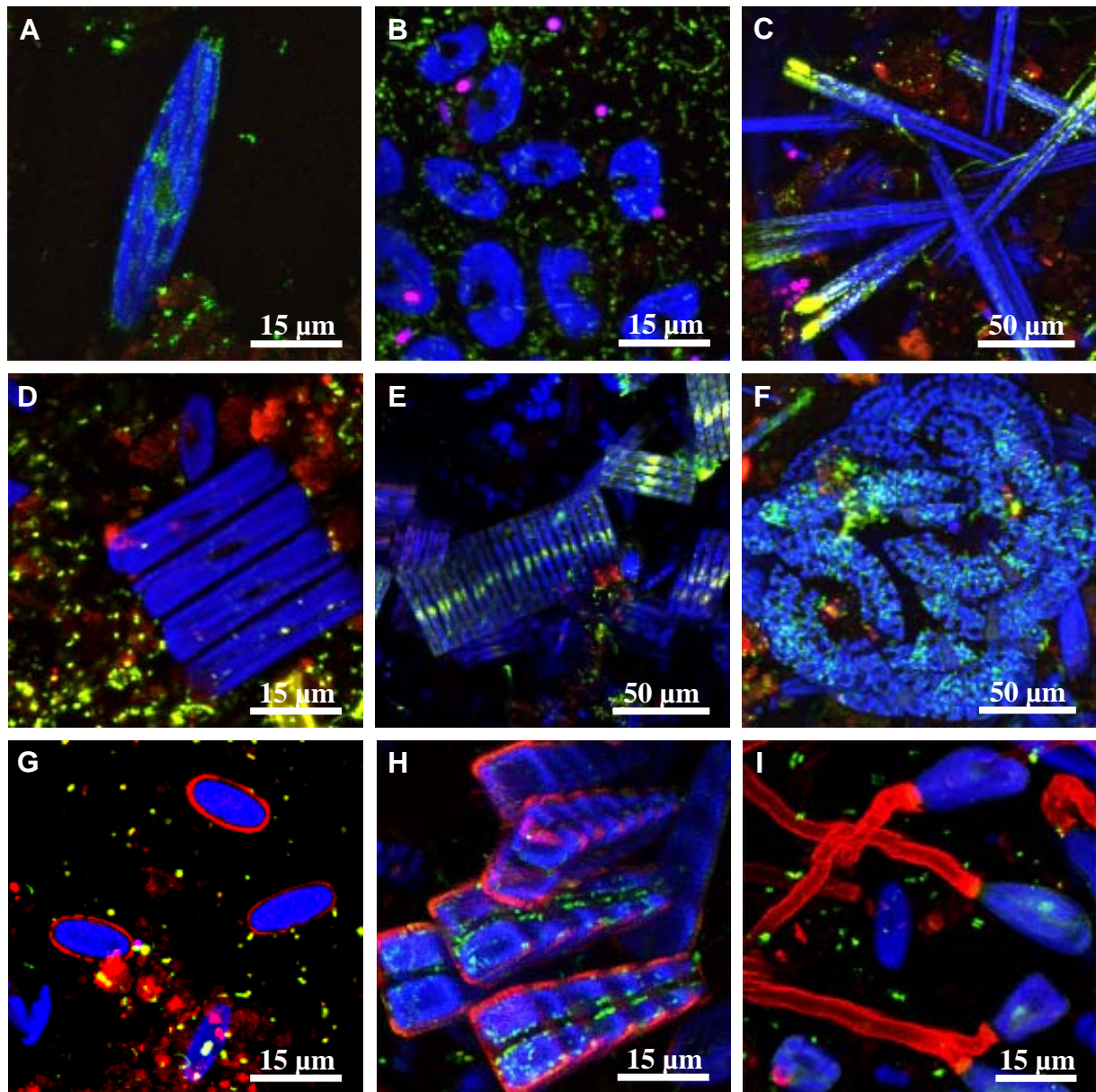


Abb. 3-16 Maximum Intensität Projektionen von CLSM-Bildern, Beispiele für die morphologische Vielfalt von Diatomen (A, B, C), die Bildung von Diatomenketten (D, E, F) sowie ihrer Produktion von Glykokonjugaten in Form von Gallertschichten (G, H) oder Gallertstiele (I), Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10

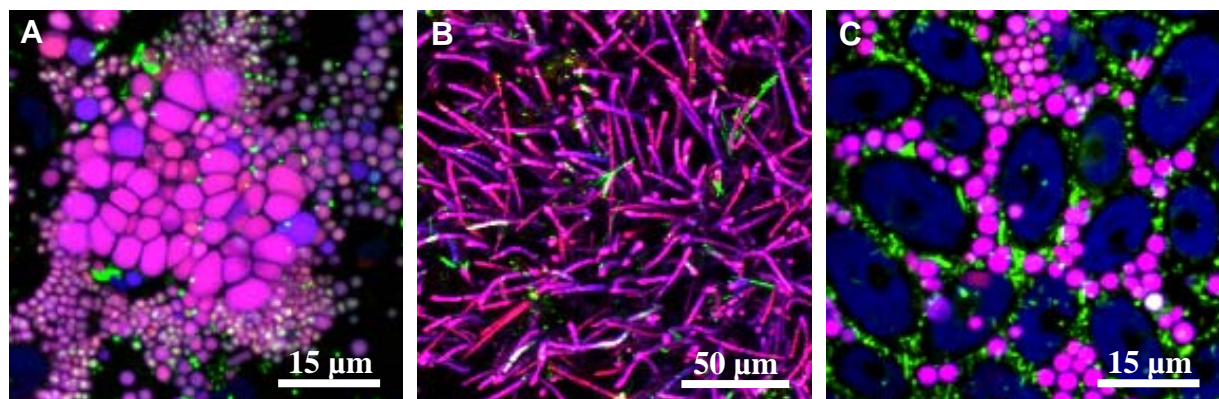


Abb. 3-17 Maximum Intensität Projektionen von CLSM-Bildern, Beispiele für die morphologische Vielfalt von Cyanobakterien, Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10

Diese Veränderung wurde durch das vermehrte Auftreten und Grazing des Makrozoobenthos ausgelöst. Vor allem am Standort Ehle 04 waren in den mikroskopischen Aufnahmen deutliche Grazingspuren zu erkennen (**Abb. 3-13 Bild D**). Die drei-dimensionalen Abbildungen eines Frühjahrs- und eines Sommer-Biofilms zeigen deutlich die Unterschiede in ihrer Struktur sowie ihrer Heterogenität (**Abb. 3-18**). Im Gegensatz zur Heterogenität der Frühjahrs-Biofilme wiesen die Sommer-Biofilme oft eine planare Struktur auf und besaßen mitunter eine gleichmäßige Verteilung der Biomasse. Nur durch das Grazing wurde diese gleichmäßige Struktur unterbrochen und freie Stellen für eine Neubesiedlung geschaffen. Die Biofilmstruktur und Biofilmzusammensetzung veränderte sich im Verlauf des Sommers kaum. Die Präsenz der Makrozoobenthosorganismen sorgte ständig für ein erneutes Abweiden der Aufwuchsträger. Die mittlere Biofilmdicke variierte während der Sommermonate nur gering und lag von Mai bis August nur zwischen 20 - 60 μm (**Abb. 3-15**). Erst im Herbst mit wahrscheinlich abnehmender Anzahl von Makrozoobenthosorganismen kam es wieder zu einem verstärkten Biofilmwachstum, gekennzeichnet durch eine Zunahme der mittleren und maximalen Biofilmdicke sowie des Bakteriovolumens, der Glykokonjugate und der Algen (**Abb. 3-14 und Abb. 3-15**).

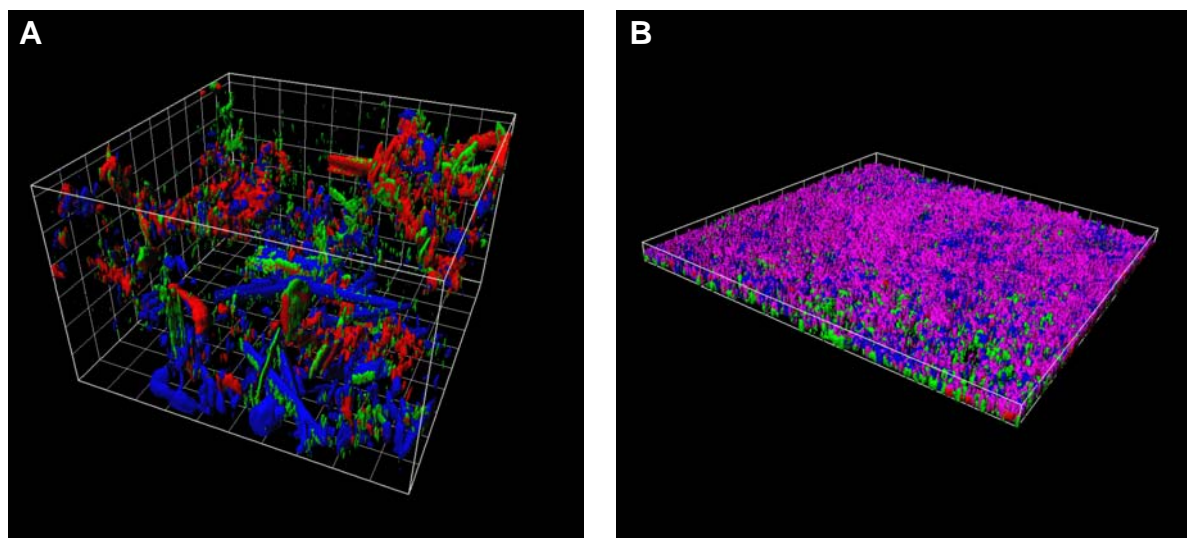


Abb. 3-18 Drei-dimensionale Darstellung (erstellt in Imaris 3) von Fließgewässerbiofilmen aufgenommen im Frühjahr (A) und Sommer (B), Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Kantenlänge entspricht 500 μm

Bei den letzten beiden Probenahmen dieser Versuchsreihe im Winter zeichnete sich das schon oben beschriebene Problem bei der Mikroskopie der Biofilm ab. Die zunehmende Dicke des Biofilms sowie die kompakten Biofilmstruktur führten dazu, dass mit dem 63 x 0,9 NA Objektiv oft nur die obersten 100 μm gescannt werden konnten. Dies wird auch an den relativ geringen Biofilmdicken deutlich. An künstlich erzeugten Abbruchkanten des Biofilms wurde unter dem Mikroskop jedoch eine Biofilmdicke von 1-1,5 mm bestimmt. Dadurch wurden das tatsächliche Volumen der einzelnen Biofilmkomponenten sowie die ermittelte Biofilmdicke stark unterschätzt.

Die zweite Versuchsreihe startete Mitte September 2000 mit dem Ausbringen weiterer Aufwuchsträger an beiden Standorten in der Ehle. Zusätzlich zu den regelmäßigen Untersuchungen wurden von dicken Biofilmen Querschnitte angefertigt. Außerdem sollten Sauerstoffkonzentrationsprofile aufgenommen werden. Dies war jedoch nur im Zeitraum von Dezember 2000 bis April 2001 möglich, da die Biofilmdicke während des Sommers und des Herbstes zu gering für den Einsatz von Mikroelektroden war.

Die Änderung der Volumen aller detektierten Biofilmkomponenten während der zweiten Versuchsreihe ist in **Abb. 3-19** dargestellt. Die mikroskopischen Aufnahmen in **Abb. 3-21** und **Abb. 3-22** zeigen die Biofilmentwicklung an den Standorten Ehle 02 und Ehle 04. Auch hier kam es in kurzer Zeit zu einer Biofilmmakkumulation, jedoch nicht so stark wie im Frühjahr. Nach nur einer Woche wurde eine mittlere Biofilmdicke von ca. 60 μm bzw. 37 μm gemessen (**Abb. 3-20**). Im Vergleich zur 1. Versuchsreihe mit dem Start im April kam es hier allerdings nicht zu einem drastischen Absinken der Biofilmdicke nach 4 Wochen, da zu dieser Zeit wahrscheinlich nur noch wenige Makrozoobenthosorganismen aktiv waren.

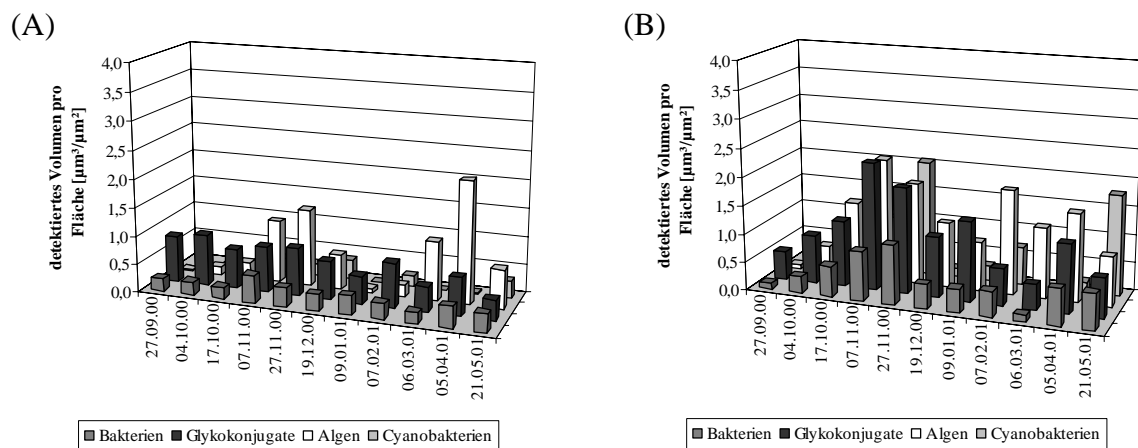


Abb. 3-19 Änderung der detektierten Biovolumen von Bakterien, Glykokonjugaten, Algen und Cyanobakterien während der 2. Versuchsreihe an den Standorten (A) Ehle 02 und (B) Ehle 04

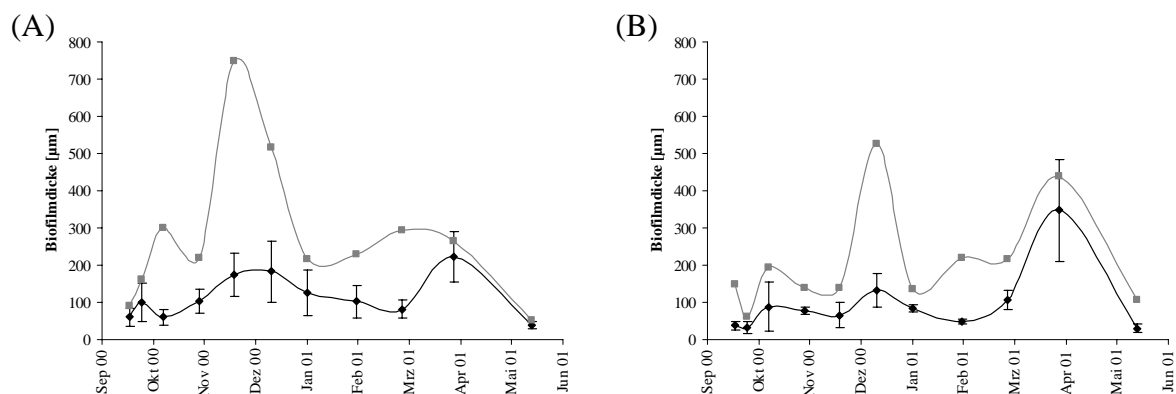


Abb. 3-20 Änderung der mittleren Biofilmdicke (schwarz) und der maximalen Biofilmdicke (grau) während der 2. Versuchsreihe an den Standorten Ehle 02 (A) und Ehle 04 (B)

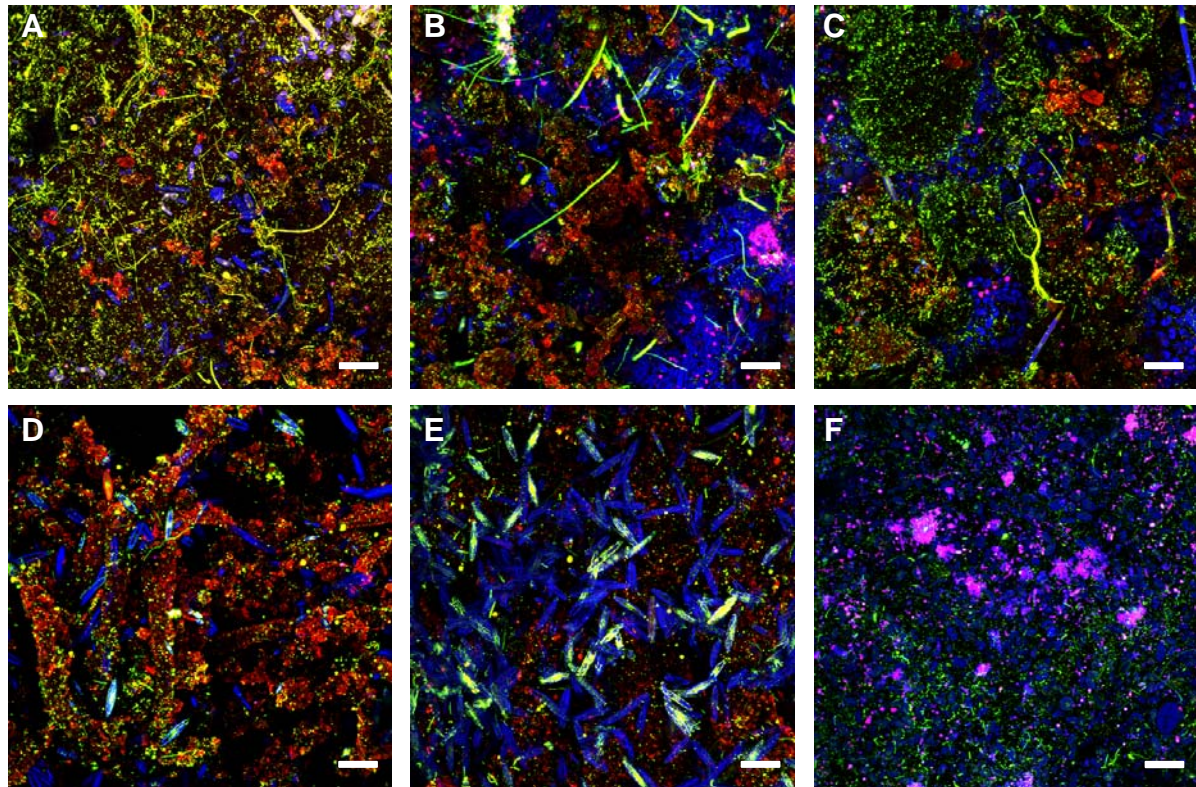


Abb. 3-21 Biofilmentwicklung am Standort Ehle 02, Exposition der Aufwuchsträger 19.09.00 (2.Versuchsreihe), Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 2 Wochen (A), 7 Wochen (B), 13 Wochen (C), 20 Wochen (D), 24 Wochen (E), 35 Wochen (F); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 µm

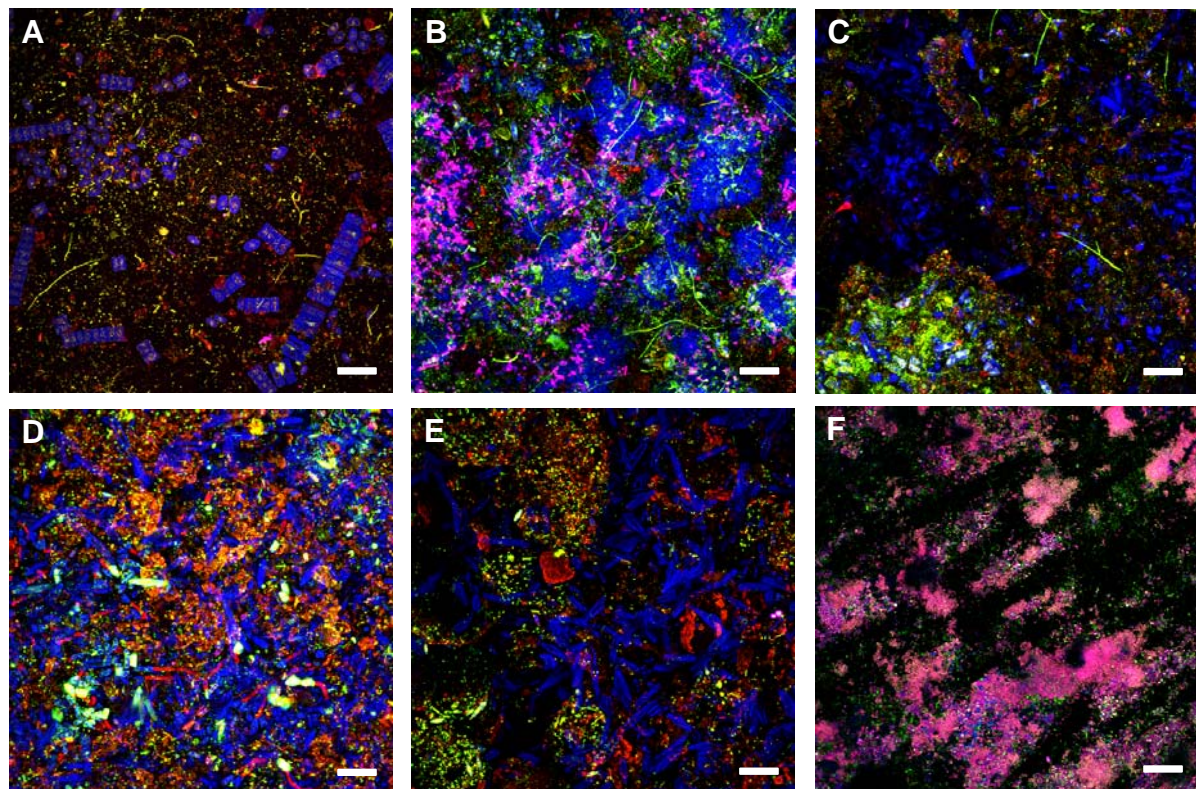


Abb. 3-22 Biofilmentwicklung am Standort Ehle 04, Exposition der Aufwuchsträger 19.09.00 (2.Versuchsreihe), Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 2 Wochen (A), 7 Wochen (B), 13 Wochen (C), 20 Wochen (D), 24 Wochen (E), 35 Wochen (F); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 µm

Während des gesamten Herbst und Winters wurde ein komplexer sehr heterogener Biofilm beobachtet. Die Volumen der einzelnen Biofilmkomponenten lagen am Standort Ehle 04 deutlich höher als am Standort Ehle 02 (**Abb. 3-19**). Vom Dezember 2000 bis April 2001 war es ebenfalls nicht möglich den Biofilm komplett zu scannen. Die mittlere Biofilmdicke am Standort Ehle 02 lag durchschnittlich nur bei ca. 150 μm und am Standort Ehle 04 sogar nur bei ca. 100 μm . Aus diesem Grund wurden von diesem Zeitpunkt an zusätzlich xz-Querschnitte mit Hilfe eines Kryotoms angefertigt. Sie zeigten, dass die tatsächliche Biofilmdicke am Standort Ehle 02 mindestens 830 μm betrug (**Abb. 3-23 A**). An künstlich erzeugten Bruchkanten konnte hier sogar eine maximale Biofilmdicke von 2000 μm bestimmt werden. Die Biofilmdicke am Standort Ehle 04 war deutlich geringer (**Abb. 3-23 C**). Im Querschnitt konnte eine Dicke von ca. 330 μm und an Bruchkanten eine Dicke von 1000 μm bestimmt werden. Auch die Biovolumen wurden bei den Routineuntersuchungen in diesem Zeitraum stark unterschätzt. Der Vergleich der ermittelten Biovolumen zeigte deutlich, dass bei den Querschnitten ein wesentlich höheres Biovolumen an Algen und Bakterien ermittelt wurde als bei den Routineuntersuchungen (**Abb. 3-19** und **Tabelle 3-10**).

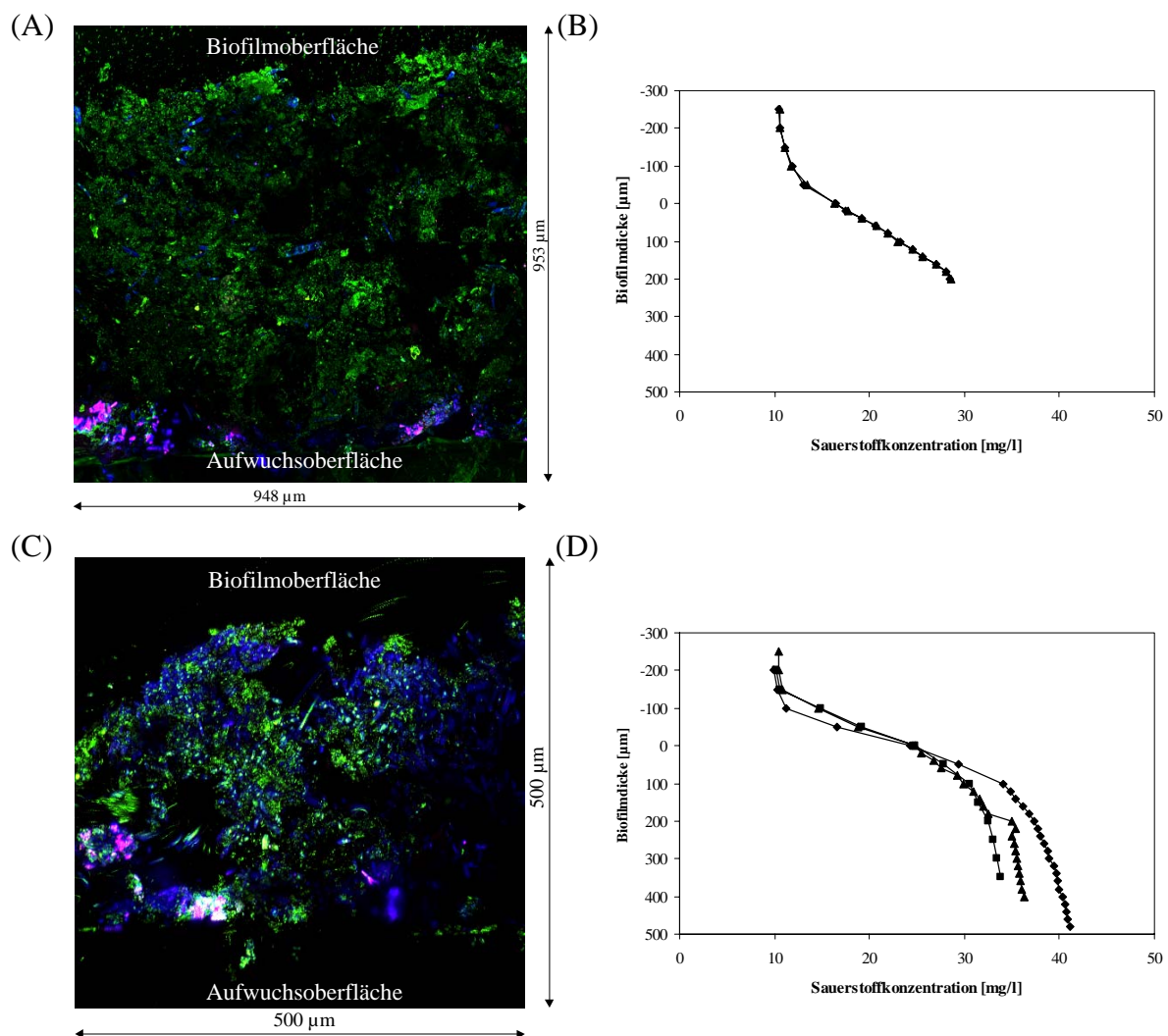


Abb. 3-23 xz-Querschnitte und die dazugehörigen Sauerstoffkonzentrationsprofile von Biofilmen der Standorte Ehle 02 (A, B) und Ehle 04 (C, D) vom Dezember 2000 (dazugehörige xy-Bilder: **Abb. 3-21 C** und **Abb. 3-22 C**)

Von den gleichen Biofilmproben wurden im Dezember Sauerstoffkonzentrationsprofile aufgenommen. An der Konzentrationsgrenzschicht Bulk/Biofilm kam es zu einem starken Anstieg der Sauerstoffkonzentration (**Abb. 3-23**) und einer hohen Massestromdichte (**Tabelle 3-10**). Auch mit zunehmender Biofilmtiefe stieg die Sauerstoffkonzentration weiter an. Der Konzentrationsanstieg sowie die maximal erreichten Konzentrationen lagen bei dem Biofilm vom Standort Ehle 04 wesentlich höher. Hier konnte eine Sauerstoffkonzentration von 40 mg/l gemessen werden, während im Biofilm vom Standort Ehle 02 nur eine Konzentration von 30 mg/l erreicht wurden. Dieser Unterschied kann aus den mikroskopischen Untersuchungen erklärt werden. Im xz-Querschnitt ist eine höhere Konzentration von photoautotrophen Mikroorganismen am Standort Ehle 04 gegenüber dem Standort Ehle 02 zu erkennen. Die Quantifizierung der Querschnitte (**Tabelle 3-10**) zeigten zwar vergleichbare Algenvolumen an beiden Standorten, jedoch ist am Standort Ehle 04 dieses Volumen in einer viel dünneren Biofilmschicht konzentriert.

Die Massestromdichten wurden mit einem Diffusionskoeffizient von 0,00021 m²/d berechnet. Die kompakte Struktur der Biofilme sowie die hohen Biofilmdicken lassen vermuten, dass der tatsächliche Diffusionskoeffizient niedriger ist und somit auch die berechneten Massestromdichten.

Tabelle 3-10 Detektierte Biovolumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$] und Biofilmdicken [μm] berechnet aus den Kryotomquerschnitten, sowie Massestromdichten j [$\text{g}/\text{m}^2\text{d}$] berechnete aus den Sauerstoffkonzentrationsprofilen der Standorte Ehle 02 und Ehle 04

Monat	Standort	detektiertes Biovolumen [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]			Biofilmdicke [μm]	Massestromdichte O_2 [$\text{g}/\text{m}^2\text{d}$]
		Bakterien	Algen	Cyanobakt.		
Dezember 2000	Ehle 02	10,20	5,31	0,90	832	13,80
	Ehle 04	4,40	5,28	0,80	332	21,09
Februar 2001	Ehle 02	4,12	4,51	0,18	924	10,37
	Ehle 04	2,45	5,07	1,93	248	37,54
März 2001	Ehle 02	12,47	12,89	3,52	über 500	27,30
	Ehle 04	12,11	50,25	1,84	1259	29,86
April 2001	Ehle 02	14,43	13,52	2,17	1263	14,89
	Ehle 04	9,57	12,61	0,95	855	19,39

Bis zum Februar kam es am Standort Ehle 02 zu keiner nennenswerten Änderung weder bei den detektierten Biovolumen, der Biofilmdicke noch bei den Sauerstoffkonzentrationsprofilen (**Abb. 3-24**). Der Biofilm vom Standort Ehle 04 wies wieder eine deutlich geringere Biofilmdicke von ca. 250 μm auf bei einem vergleichbaren Volumen an photoautotrophen Mikroorganismen. Dies resultierte in einem sehr starken Anstieg der Sauerstoffkonzentration von 37 bis 40 mg/l innerhalb der ersten 100 μm des Biofilms.

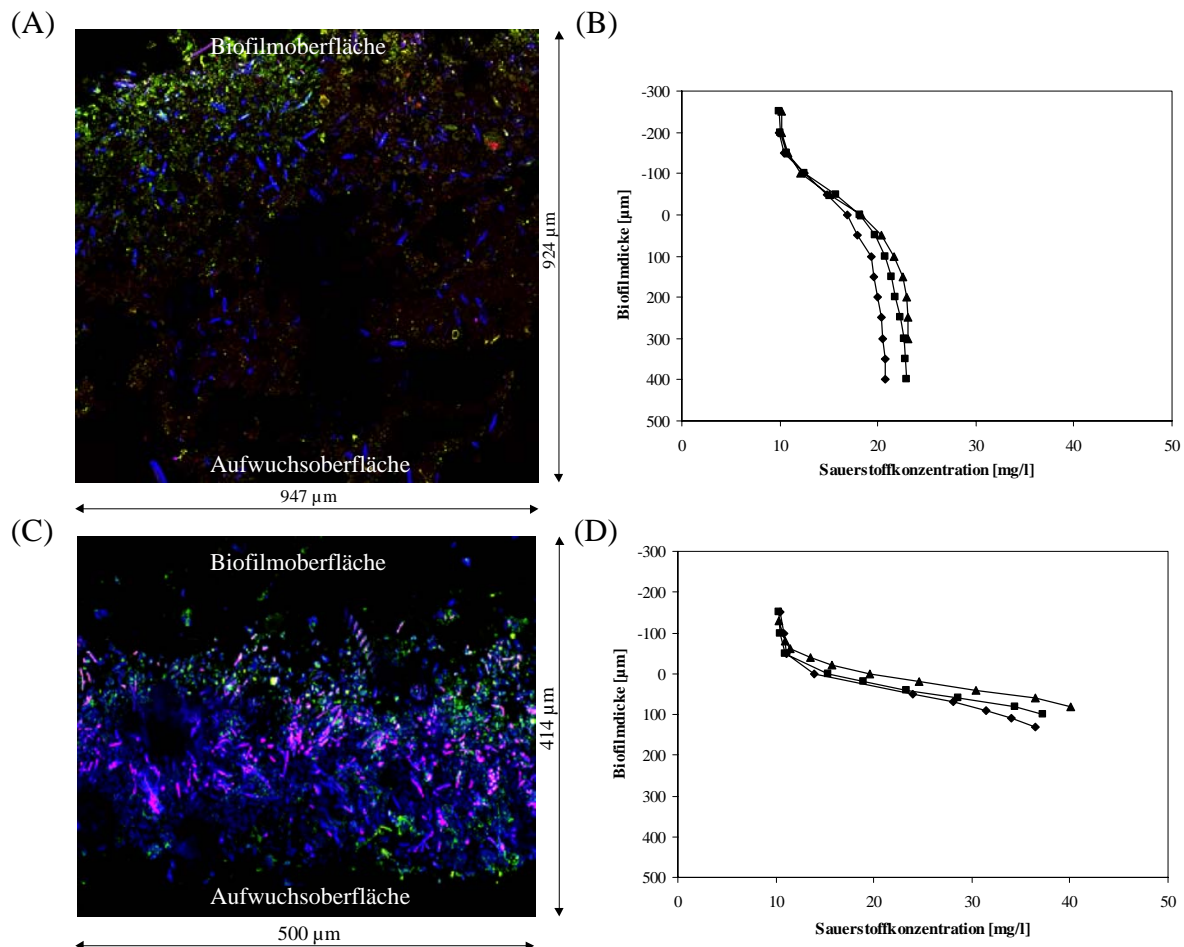


Abb. 3-24 xz-Querschnitte und die dazugehörigen Sauerstoffkonzentrationsprofile von Biofilmen der Standorte Ehle 02 (A, B) und Ehle 04 (C, D) vom Februar 2001 (dazugehörige xy-Bilder: **Abb. 3-14 D** und **Abb. 3-15 D**)

Im Frühjahr kam es zu einem deutlichen Anstieg des Algenvolumens an beiden Standorten. Die Biofilmdicke nahm in dieser Zeit vor allem am Standort Ehle 04 deutlich zu und betrug an Bruchkanten ca. 2300 μm (Ehle 02) bzw. 1700 μm (Ehle 04). Die oberste Biofilmschicht bestand überwiegend aus Algen, oft bildeten sich sogar dicke Algenpolster einer einzigen Algenart aus. Sauerstoffprofile wurden im März von Biofilmen aus der 1. sowie aus der 2. Versuchsreihe aufgenommen. Trotz eines Altersunterschieds der Biofilme von einem halben Jahr unterschieden sich die Sauerstoffprofile nur unwesentlich (**Abb. 3-25 C, D**). Alle Biofilme wiesen einen extremen Anstieg der Sauerstoffkonzentration an der Biofilmoberfläche auf. Ab einer Biofilmtiefe von 300 μm kam es in den Biofilmen vom Standort Ehle 02 zu einer stetigen Abnahme der Sauerstoffkonzentration. Dies wurde in den Biofilmen aus beiden Versuchsreihen beobachtet. In einer Tiefe von 1900 μm wurde nur noch eine Konzentration von 10 bis 15 mg/l gemessen. In den Biofilmen vom Standort Ehle 04 stieg die Konzentration hingegen weiter bis fast auf 60 mg/l in einer Tiefe von 1400 μm an. Aus den xz-Querschnitten erkennt man, dass der gesamte Biofilm aus dicht aneinander liegenden Algenzellen bestand (**Abb. 3-25 B**). Hingegen wies der Biofilm vom Standort Ehle 02 eine sehr lockere Struktur auf mit einer dünnen Algenschicht an der Oberfläche (**Abb. 3-25 A**). Die Querschnitte und die daraus berechneten Algenvolumen erklären somit die starken Unterschiede in den Sauerstoffkonzentrationsprofilen zwischen den beiden Standorten (**Abb. 3-25, Tabelle 3-10**).

Im April konnten ähnliche Sauerstoffprofile an beiden Standorten gemessen werden (**Abb. 3-25**), jedoch war der Konzentrationsanstieg an der Biofilmoberfläche etwas geringer. Der Biofilm vom Standort Ehle 04 wies eine geringere Biofilmdicke von ca. 855 μm auf.

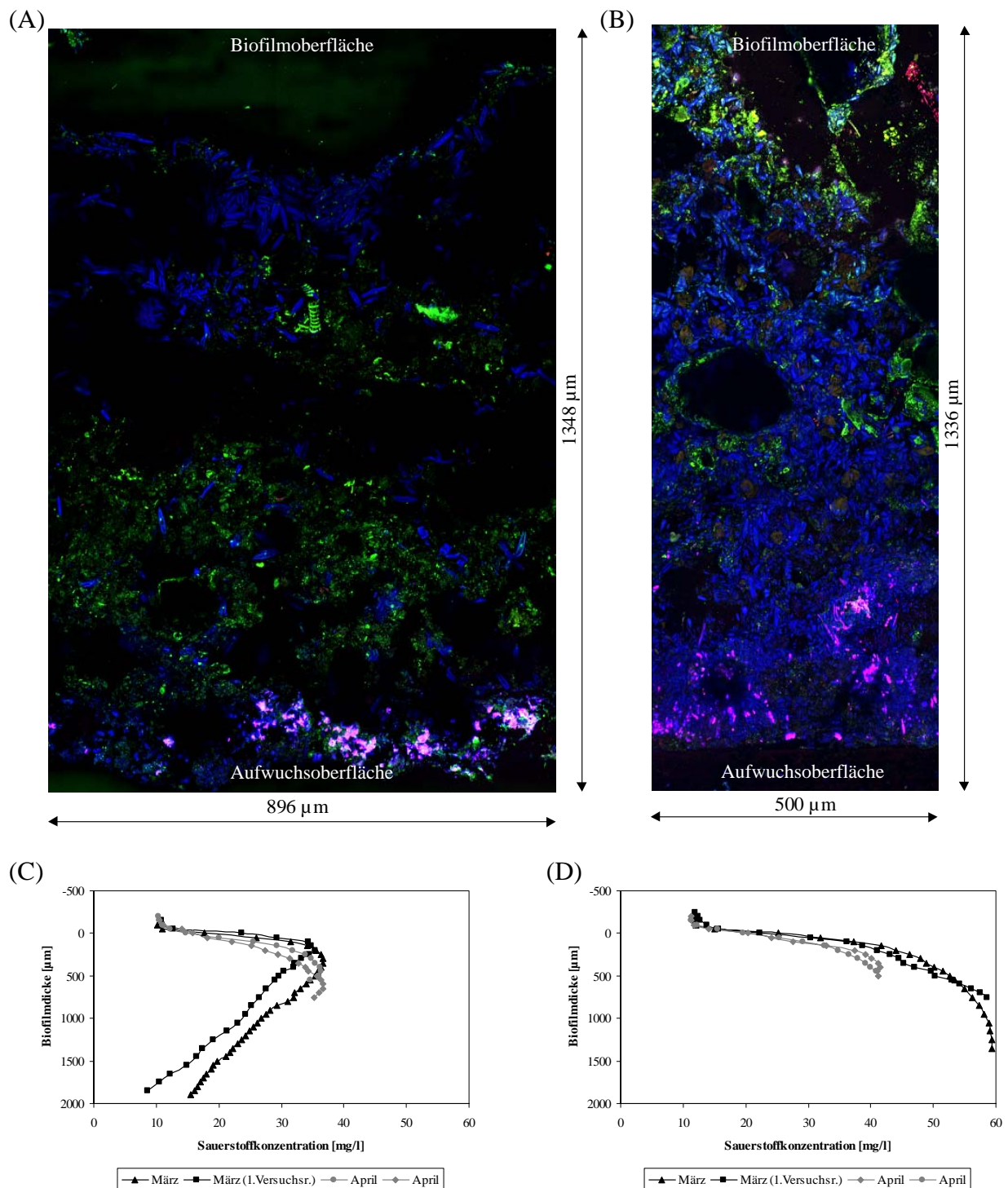


Abb. 3-25 xz-Querschnitte und die dazugehörigen Sauerstoffkonzentrationsprofile von Biofilmen der Standorte Ehle 02 (A, C) und Ehle 04 (B, D) vom März 2001 (aus den Versuchsreihen 1 und 2) und April 2001 (aus der Versuchsreihe 2)

Im Mai kam es jedoch wieder zu einer starken Abnahme der Biofilmdicke sowie zu einer Zunahme des Cyanobakterienvolumens. Die Zusammensetzung und Struktur des Biofilms war vergleichbar mit der aus der 1. Versuchsreihe zur gleichen Jahreszeit. Die mittlere Biofilmdicke sank auf nur 38 μm bzw. 30 μm und die maximale Biofilmdicke auf 51 μm bzw. 107 μm . Die Biofilmaufnahmen am Standort Ehle 04 wiesen wieder die charakteristischen Grazingspuren auf (**Abb. 3-22 Bild F**).

Zwischen den detektierten Biovolumen an photoautotrophen Mikroorganismen und den gemessenen Massestromdichten von Sauerstoff (Daten in **Tabelle 3-10**) der in der Ehle untersuchten Biofilmproben konnte eine hohe Korrelation festgestellt werden (**Abb. 3-26**). Dabei wurden die Cyanobakterien dreimal so hoch gewichtet wie die Algen (Diatomen), da sie höhere Photosyntheseraten aufweisen. Mit Zunahme des Biovolumens an photoautotrophen Mikroorganismen steigt die Massestromdichte des Sauerstoffs linear an.

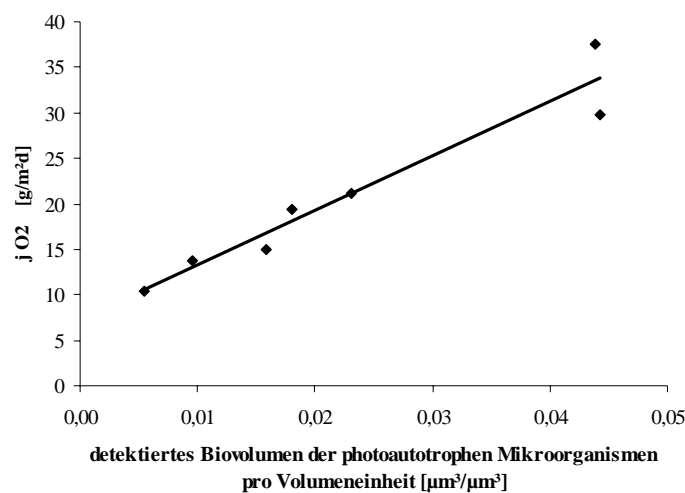


Abb. 3-26 Korrelation des detektierten Biovolumens der photoautotrophen Mikroorganismen pro Volumeneinheit Biofilm (berechnet aus den Kryotomquerschnitten) mit der gemessenen Massestromdichte von Sauerstoff der Biofilmproben von Dezember 2000 bis April 2001 der Standorte Ehle 02 und Ehle 04

Unterschiedlich alte Biofilme von verschiedenen Aufwuchsträgern zeigten die gleiche Biofilmstruktur und Biofilmzusammensetzung sowie wiesen sie sehr ähnliche Sauerstoffkonzentrationsprofile auf. Insofern kann man davon ausgehen, dass sich im Gewässer nach einer kurzen Initialphase auf neu ausgebrachten Aufwuchsträgern eine für die Jahreszeit charakteristische Biofilmstruktur und Biofilmzusammensetzung ausbildet. Demnach sind Frühjahrsbiofilme durch eine hohe Konzentration und Diversität von Algen, ein hohes Volumen an Glykokonjugaten und Bakterien sowie durch eine hohe Biofilmdicke charakterisiert. Diese Biofilme weisen komplexe Strukturen sowie eine hohe Heterogenität auf. Während des gesamten Sommers bildet sich nur ein sehr dünner Biofilm aus, der durch einen hohen Anteil an Cyanobakterien gekennzeichnet ist. Diese Biofilme besitzen oft eine planare Struktur und eine relativ gleichmäßige Verteilung der Biofilmbestandteile. Die Biofilme weisen häufig Grazingspuren von Makrozoobenthosorganismen auf. In Verlauf des Herbstes und Winters kommt es durch das Biofilmwachstum und dem verminderten Grazingdruck zu einer Zunahme der Biofilmdicke, des Bakterien-, Glykokonjugat- und Algen-Volumens sowie der Komplexität der Biofilmstruktur.

3.3.3 Einfluss der Hydrodynamik und der Nährstoffbedingungen auf die Biofilmstruktur und die Biofilmentwicklung

3.3.3.1 RAR-Experiment 1: Biofilmentwicklung im Rotating Annular Reaktor und Einfluss der Hydrodynamik auf die Biofilmstruktur

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der CLSM-Bilder zeigten, dass die Entwicklung der Biofilme in den Reaktoren viel länger dauerte als im Fließgewässer (**Abb. 3-27**). Erst nach zwei Wochen konnte in beiden Reaktoren eine maximale Biofilmdicke von 33 μm gemessen werden (**Abb. 3-30**). In den ersten Tagen siedelten sich einzelne Bakterien an, die unterschiedlichsten Morphotypen zugeordnet werden konnten (**Abb. 3-28 und Abb. 3-29**). Erst nach 2 Wochen wurden vereinzelt Algen beobachtet. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Entwicklung in beiden Reaktoren vergleichbar. Nach 4 Wochen kam es zu einem verstärkten Biofilmwachstum, gekennzeichnet durch eine Zunahme der Biofilmdicken und der Volumen der einzelnen Biofilmkomponenten. Vor allem wurde eine starke Volumenzunahme der Glykokonjugate und Algen beobachtet (**Abb. 3-27**). Biofilme gewachsen bei einer geringen hydrodynamischen Beanspruchung zeigten eine stärkere Akkumulation von Glykokonjugaten und eine schnellere Zunahme der Biofilmdicke auf 200 μm , welche dann allerdings bis zum Ende des Experiments relativ konstant blieb. Unter hoher hydrodynamischer Beanspruchung kam es nur kurzzeitig zu einer Akkumulation von Glykokonjugaten. Die Biofilmdicke stieg in diesem Reaktor langsamer aber kontinuierlich bis auf ca. 219 μm (**Abb. 3-30**).

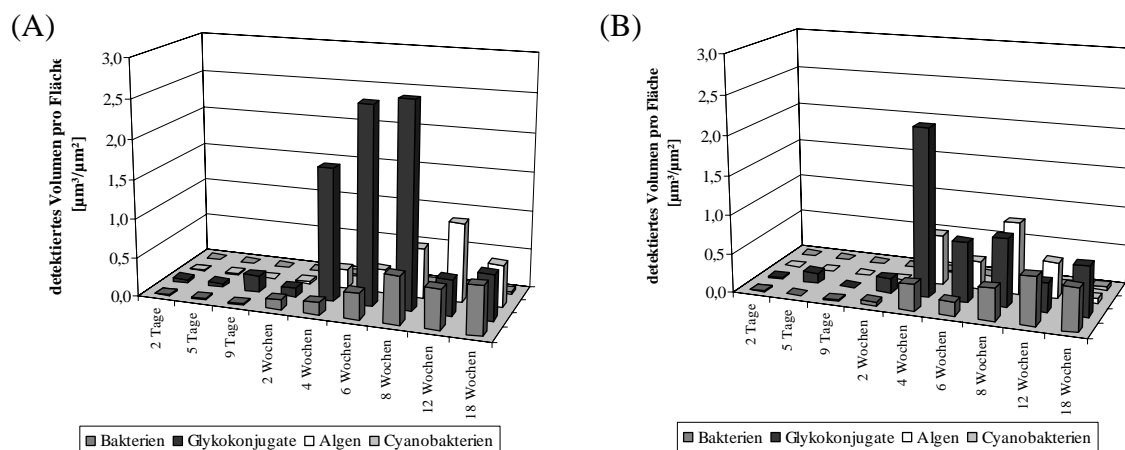


Abb. 3-27 Änderung der detektierten Biovolumen von Bakterien, Glykokonjugaten, Algen und Cyanobakterien in den Rotating-Annular-Reaktoren bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 65 rpm (A) und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 130 rpm (B)

Zum Ende des Experiments wies der Biofilm gewachsen bei einer höheren hydrodynamischen Beanspruchung eine etwas größere mittlere sowie maximale Biofilmdicke auf. Das Volumen an Bakterien und Glykokonjugaten waren in beiden Reaktoren vergleichbar. Das Volumen an Algen sank zum Ende des Experimentes im Reaktor mit hoher hydrodynamischer Beanspruchung und war zu dieser Zeit deutlich geringer als im anderen Reaktor. Cyanobakterien wurden während des gesamten Experimentes in beiden Reaktoren nur selten und mit einem sehr geringen Volumen gefunden (**Abb. 3-27**).

Während die Biofilmdicke sowie die Biovolumen sich nur gering zwischen beiden Reaktoren unterschied, zeigten sich große Unterschiede in der Biofilmstruktur. Die Biofilme gewachsen bei einer geringen hydrodynamischen Beanspruchung waren zwar sehr kompakt und die

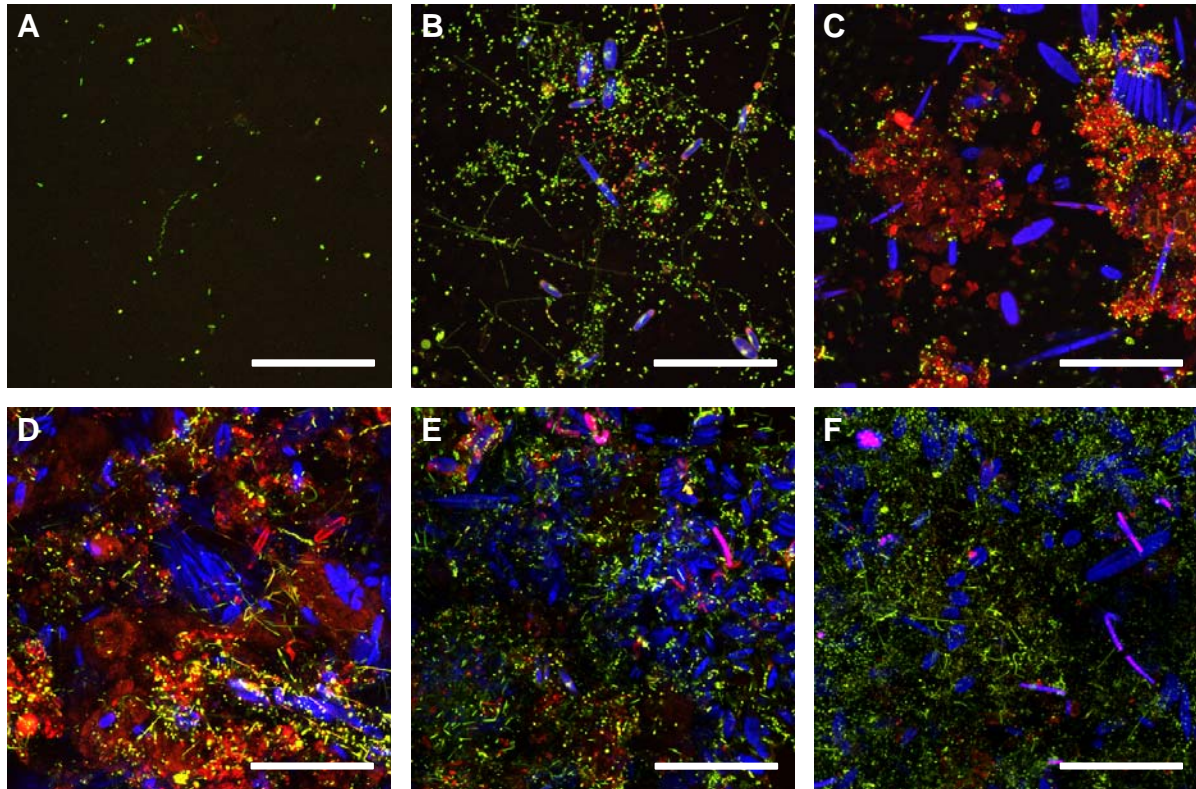


Abb. 3-28 Biofilmentwicklung im RAR bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 65 rpm, Reaktorstart 05.04.00, Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 5 Tagen (A), 2 Wochen (B), 4 Wochen (C), 9 Wochen (D), 12 Wochen (E), 18 Wochen (F); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 μ m

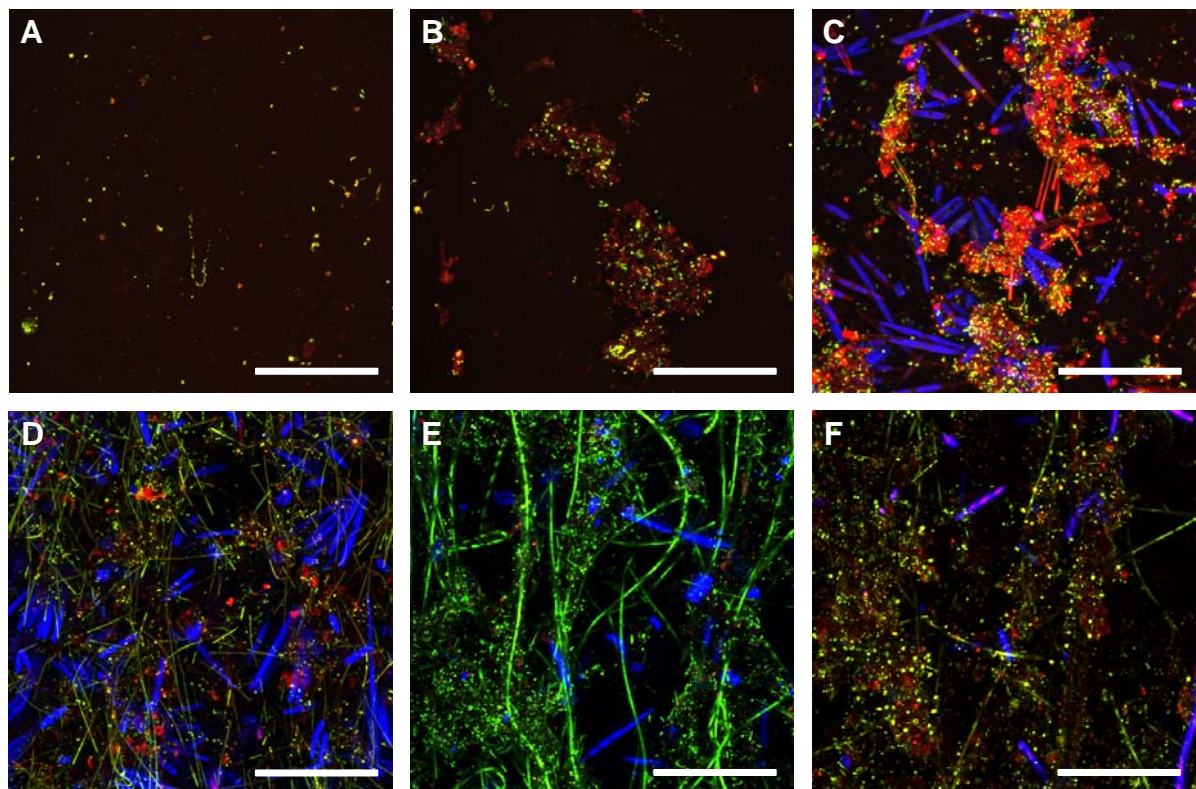


Abb. 3-29 Biofilmentwicklung im RAR bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 130 rpm, Reaktorstart 05.04.00, Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 5 Tagen (A), 2 Wochen (B), 4 Wochen (C), 9 Wochen (D), 12 Wochen (E), 18 Wochen (F); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 μ m

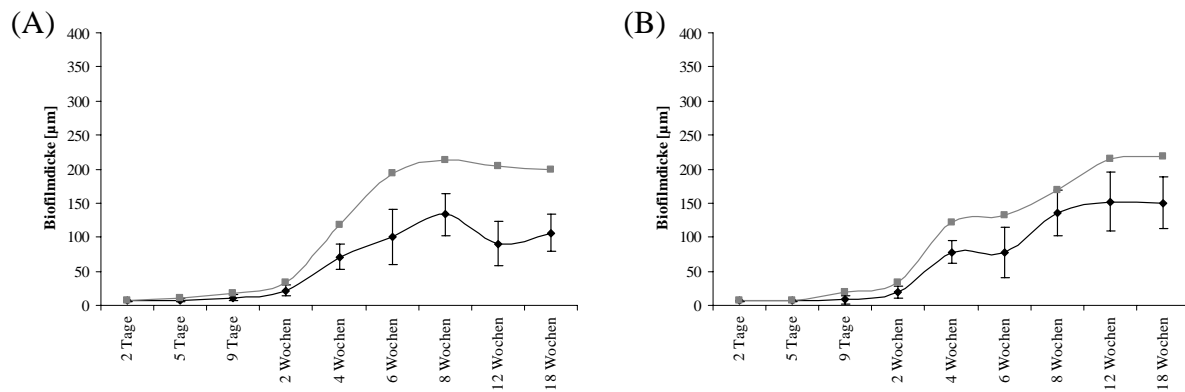


Abb. 3-30 Änderung der mittleren Biofilmdicke (schwarz) und der maximalen Biofilmdicke (grau) in den Rotating-Annular-Reaktoren bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 65 rpm (A) und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 130 rpm (B)

Komponenten waren heterogen verteilt, jedoch gab es keine besonderen strukturellen Merkmale (Abb. 3-31 A, B). Biofilme gewachsen bei einer hohen hydrodynamischen Beanspruchung zeigten eine parallel zur Fließrichtung ausgerichtete Struktur (Abb. 3-31 C, D).

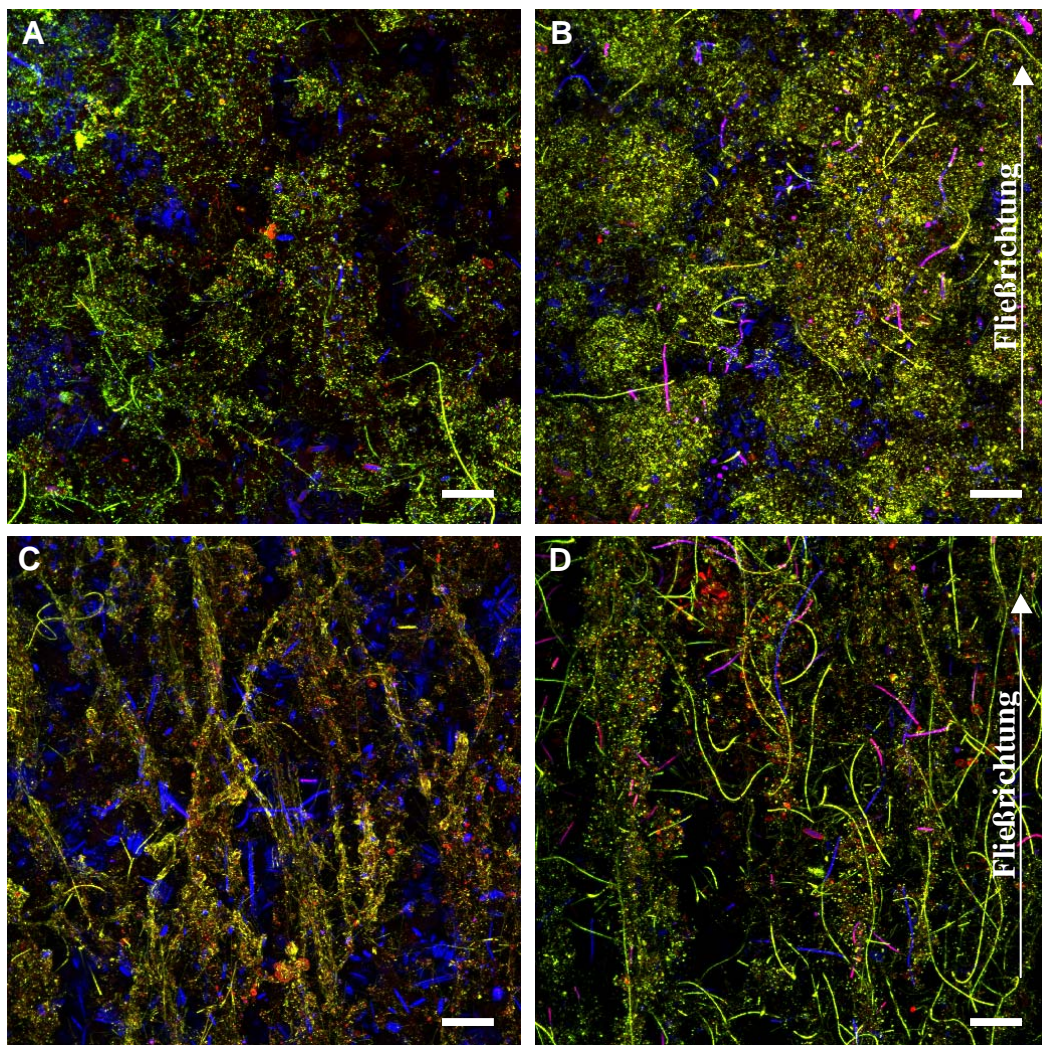


Abb. 3-31 Übersichtsaufnahmen mit dem 20x Objektiv zur Darstellung der Biofilmstruktur im RAR bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 65 rpm (A, B) sowie von 130 rpm (C, D), Maximum Intensität Projektion der CLSM-Biofilmbilder nach 12 Wochen (A, C), 18 Wochen (B, D); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 μm

Der Biofilm wies sogenannte „ridges“ auf, die Biomasse konzentriert sich dabei in schmalen Streifen, welche sich nach der Strömung ausrichten. Auch das Wachstum von filamenten Bakterien wurde von der Fließrichtung beeinflusst.

3.3.3.2 RAR-Experiment 2: Einfluss von Ammonium auf die Biofilmentwicklung und die Biofilmstruktur

Die quantitative Auswertung der CLSM-Bilder des 2. RAR-Experiments zeigte deutliche Unterschiede in den ermittelten Volumen der Biofilmkomponenten zwischen den zwei Reaktoren mit unterschiedlicher Ammoniumkonzentration (**Abb. 3-32**). Die Rotationsgeschwindigkeit betrug in beiden Reaktoren 130 rpm. Auch bei diesem Experiment kam es erst nach 4 Wochen zu einem deutlichen Anstieg der Volumen. Der Biofilm entwickelte sich im Reaktor mit Ammoniumzugabe wesentlich besser als im Reaktor, welcher ausschließlich mit Ehle-Wasser betrieben wurde. Nach 10 Wochen wies der Biofilm aus dem Reaktor mit Ammoniumzugabe ein mindestens doppelt so hohes Volumen an Bakterien, Glykokonjugaten, Algen sowie Cyanobakterien auf. Wobei die Cyanobakterien wieder eine untergeordnete Rolle bei der Biomassebildung in beiden Reaktoren spielten. Auch die xz-Querschnitte der 13 Wochen alten Biofilme zeigen deutlich diesen Unterschied zwischen den beiden Reaktorbiofilmen (**Abb. 3-36**).

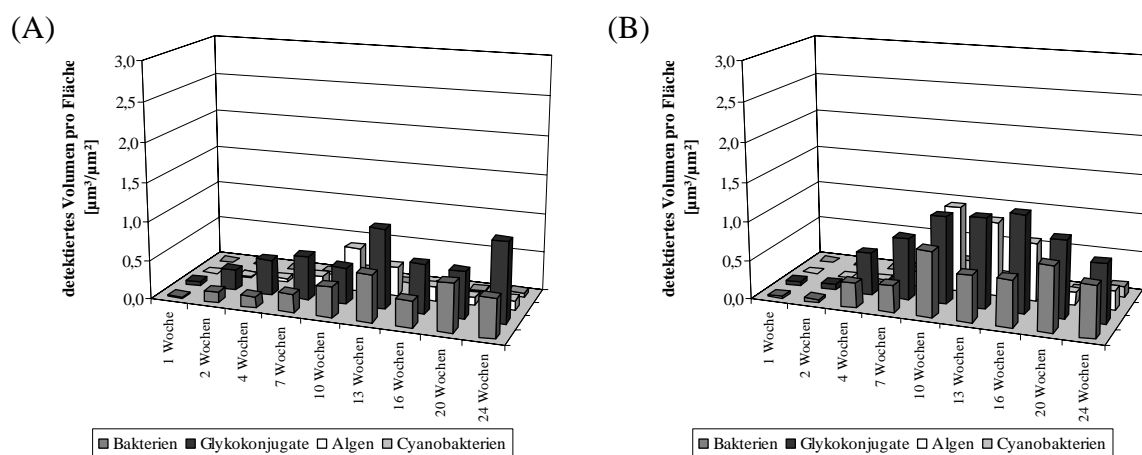


Abb. 3-32 Änderung der detektierten Biovolumen von Bakterien, Glykokonjugaten, Algen und Cyanobakterien in den Rotating-Annular-Reaktoren betrieben mit Ehle-Wasser (A) sowie mit einer Zugabe von Ammonium (B)

Die mittlere sowie die maximale Biofilmdicke nahmen im Reaktor mit Ammoniumzugabe gleichmäßig während des Experimentes zu und lagen am Ende deutlich höher als im Reaktor ohne zusätzlicher Ammoniumzugabe (**Abb. 3-35**). Die mikroskopischen Aufnahmen in **Abb. 3-33 und Abb. 3-34** zeigen die Entwicklung der Biofilme in beiden Reaktoren. Die Biofilme zeigten wieder die nach der Fließrichtung ausgerichtete Struktur, da sie ebenfalls unter hoher hydrodynamischer Beanspruchung gewachsen waren. Zwischen den Biofilmen mit unterschiedlicher Ammoniumversorgung konnten keine auffälligen Unterschiede in der Biofilmstruktur aus den mikroskopischen Aufnahmen gefunden werden.

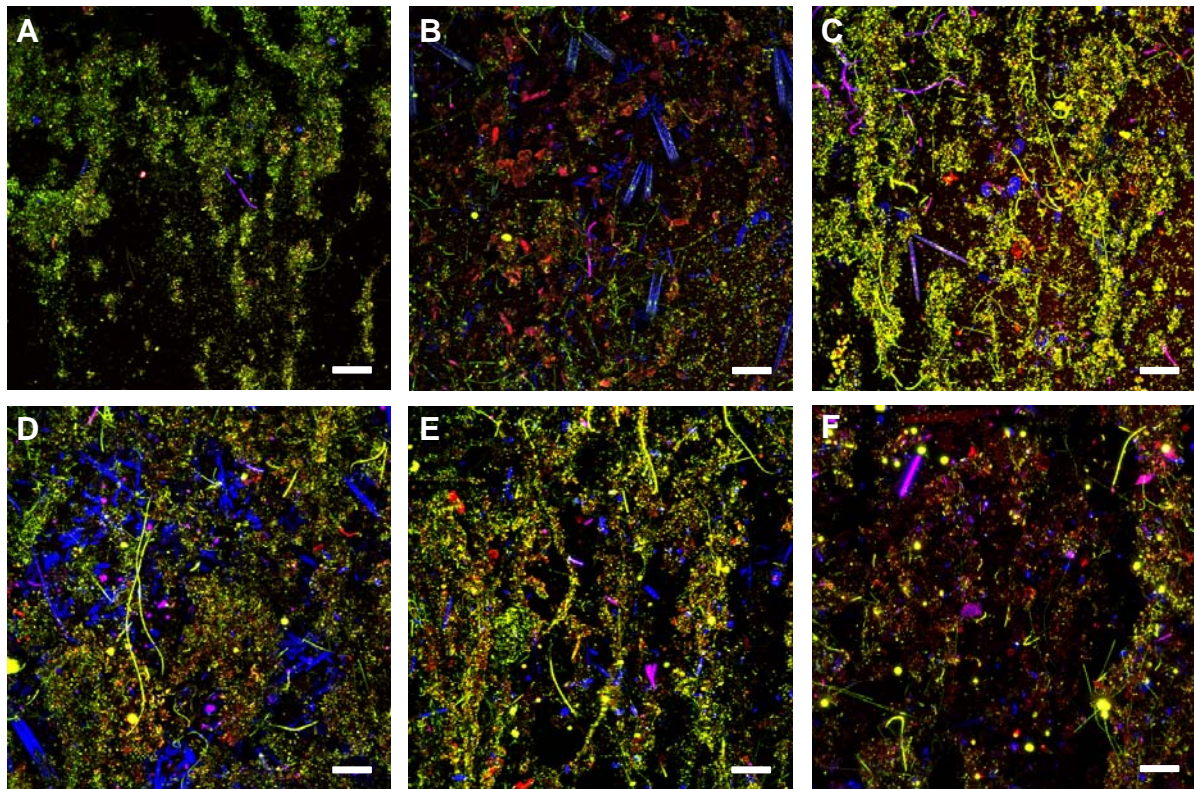


Abb. 3-33 Biofilmentwicklung im RAR betrieben mit Ehle-Wasser, Reaktorstart 19.09.00, Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 2 Wochen (A), 4 Wochen (B), 7 Wochen (C), 13 Wochen (D), 20 Wochen (E), 24 Wochen (F); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 μ m

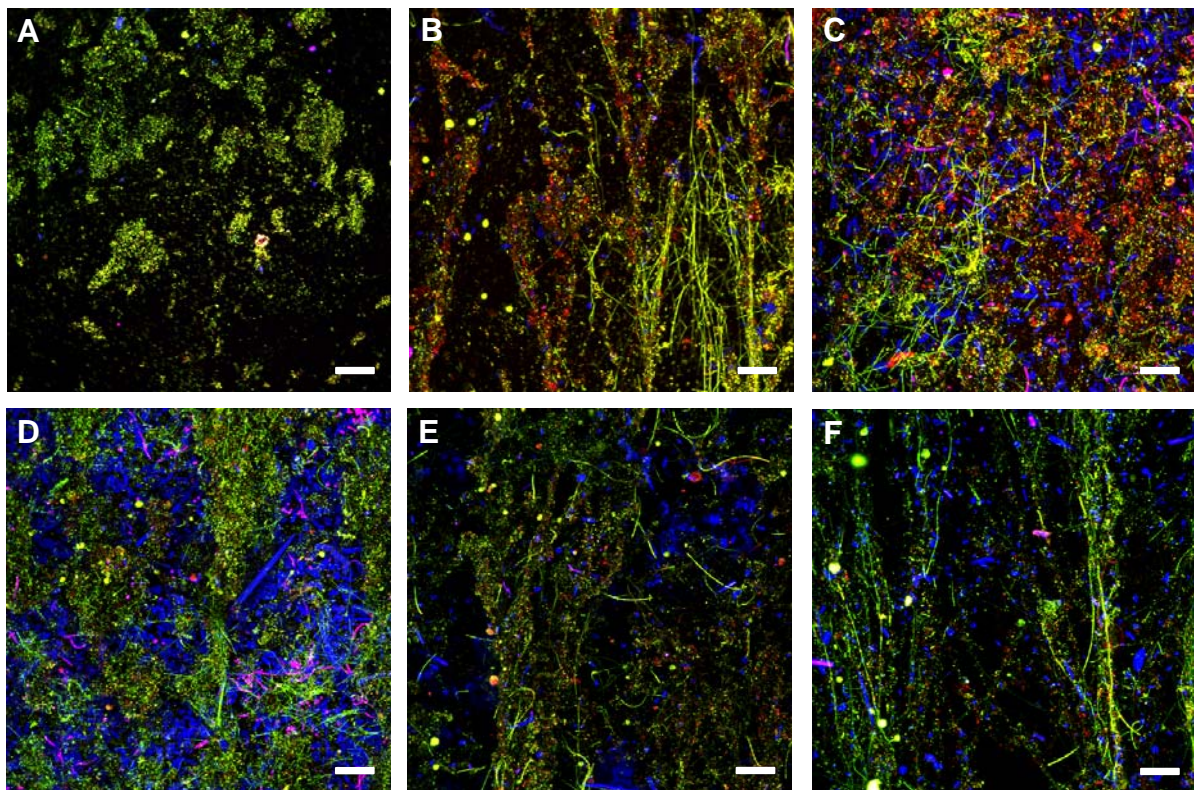


Abb. 3-34 Biofilmentwicklung im RAR betrieben mit Ammonium angereichertem Ehle-Wasser, Reaktorstart 19.09.00, Maximum Intensität Projektion der CLSM-Bilder nach 2 Wochen (A), 4 Wochen (B), 7 Wochen (C), 13 Wochen (D), 20 Wochen (E), 24 Wochen (F); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 50 μ m

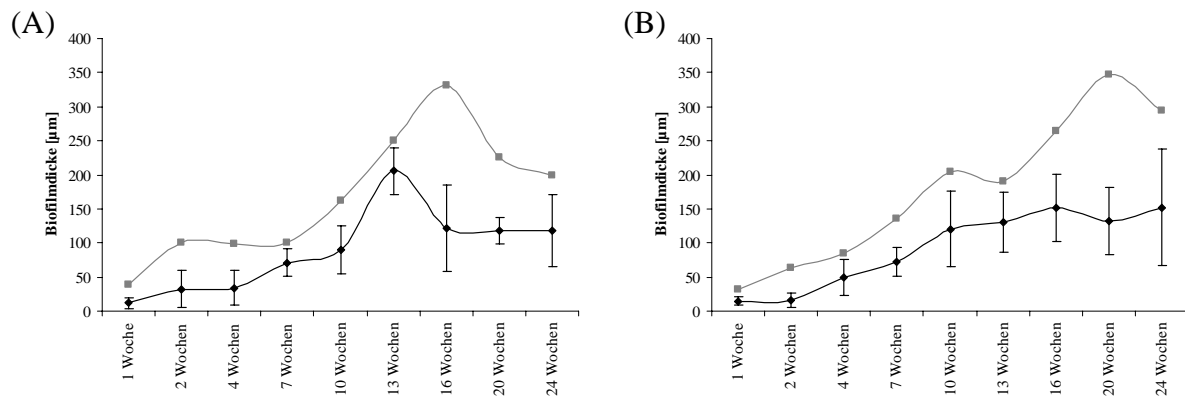


Abb. 3-35 Änderung der mittleren Biofilmdicke (schwarz) und der maximalen Biofilmdicke (grau) in den Rotating-Annular-Reaktoren betrieben mit Ehle-Wasser (A) sowie mit einer Zugabe von Ammonium (B)

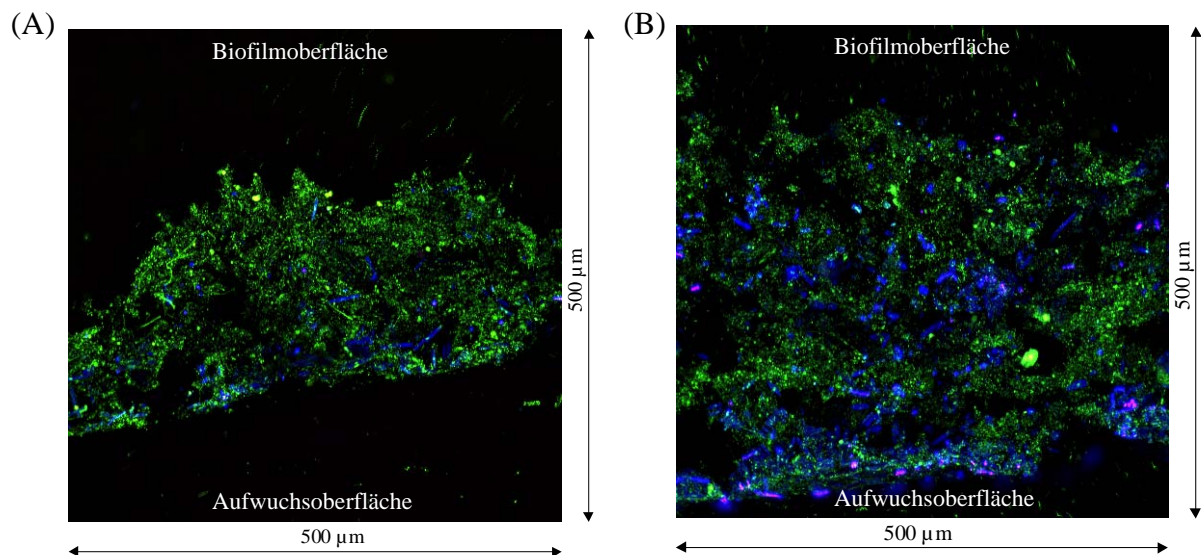


Abb. 3-36 xz-Querschnitt von Reaktorbiofilmen (A) angezogen mit Ehle-Wasser und (B) angezogen mit Ammonium angereichertem Ehle-Wasser (Biofilmalter: 13 Wochen)

Am Ende des Experimentes lagen die ermittelten Biovolumen aller Biofilmkomponenten sowie die Biofilmdicken bei dem Reaktorbiofilm mit angereichertem Ammoniumwasser deutlich höher als im Vergleichsbiofilm mit reinem Ehle-Wasser. Das detektierte Volumen der Algen nahm jedoch in beiden Reaktoren zum Ende hin kontinuierlich ab. Dies zeigte sich jedoch nicht in den xz-Querschnitten. Die Biofilme aus der 13. Woche sowie aus der 20. Woche wiesen eine ähnliche Biofilmmzusammensetzung auf (**Abb. 3-36** und **Abb. 3-37**).

Die Sauerstoffkonzentrationsprofile beider Reaktorbiofilme wiesen eine deutliche Sauerstoffproduktion auf (**Abb. 3-37**). Diese war im Reaktor mit Ammonium angereichertem Ehle-Wasser deutlich höher mit einer Massestromdichte von $3,88 \text{ g/m}^2\text{d}$ für die 20. Woche und von $4,37 \text{ g/m}^2\text{d}$ für die 24. Woche. Im Reaktorbiofilm angezogen nur mit Ehle-Wasser konnte dagegen nur eine Massestromdichte von $1,16 \text{ g/m}^2\text{d}$ für die 20. Woche und von $2,82 \text{ g/m}^2\text{d}$ für die 24. Woche ermittelt werden. Die Abnahme des detektierten Algenvolumens ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass am Ende des Experiments nicht mehr der gesamte Biofilm gescannt werden konnte. Die Querschnitte zeigten, dass der Großteil der Algen sich jedoch gerade in den unteren Biofilmschichten befand.

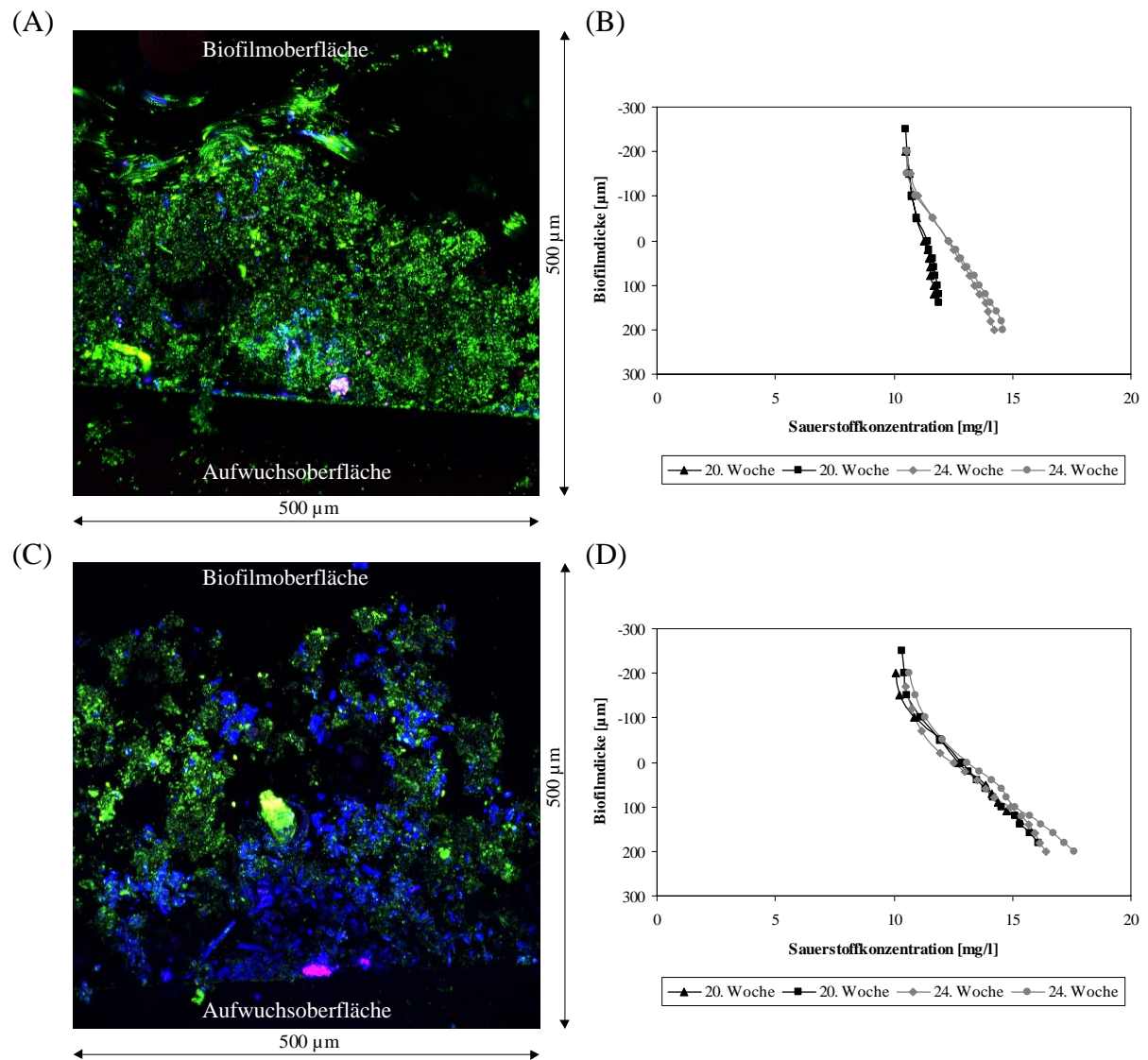


Abb. 3-37 xz-Querschnitt und die dazugehörigen Sauerstoffkonzentrationsprofile von Reaktorbiofilmen angezogen mit Ehle-Wasser (A, B) sowie angezogen mit Ammonium angereicherten Ehle-Wasser (C, D); Alter: 20 Wochen bzw. 24 Wochen

3.3.4 Einfluss der Hydrodynamik auf natürliche Biofilme aus dem South-Saskatchewan-River

Um den Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Struktur von natürlichen Biofilmen untersuchen zu können, wurden Biofilmproben aus dem South-Saskatchewan-River gesammelt und mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop sowie mit Sauerstoff-mikroelektroden untersucht. Hierfür wurden mit Biofilm bewachsenes Holz sowie Muschelschalen aus der Flussmitte und vom Flussrand gesammelt.

Schon bei der mikroskopischen Untersuchung der Biofilmproben zeigten sich deutliche Unterschiede bei den hydrodynamisch unterschiedlich beanspruchten Biofilmen sowohl auf den Muschelschalen als auch auf den Holzstücken (**Abb. 3-38**). Biofilme aus der Flussmitte waren geprägt von großen Algen- und Cyanobakterienfilamenten, die die Biofilmoberfläche überspannten und oft großflächig netzartige Strukturen bildeten. Die Anzahl von solchen Filamenten war in Biofilmen vom Flussrand wesentlich geringer.

Die Ergebnisse der quantitativen Bildanalyse zeigen deutlich, dass die photoautotrophen Mikroorganismen den größten Anteil an der Gesamtbiomasse in allen untersuchten Proben stellen (**Abb. 3-39**). Bakterien konnten nur zu einem geringen Anteil detektiert werden. In allen Proben konnten Glykokonjugate als ein wesentlicher Bestandteil von natürlichen benthischen Biofilmen nachgewiesen werden.

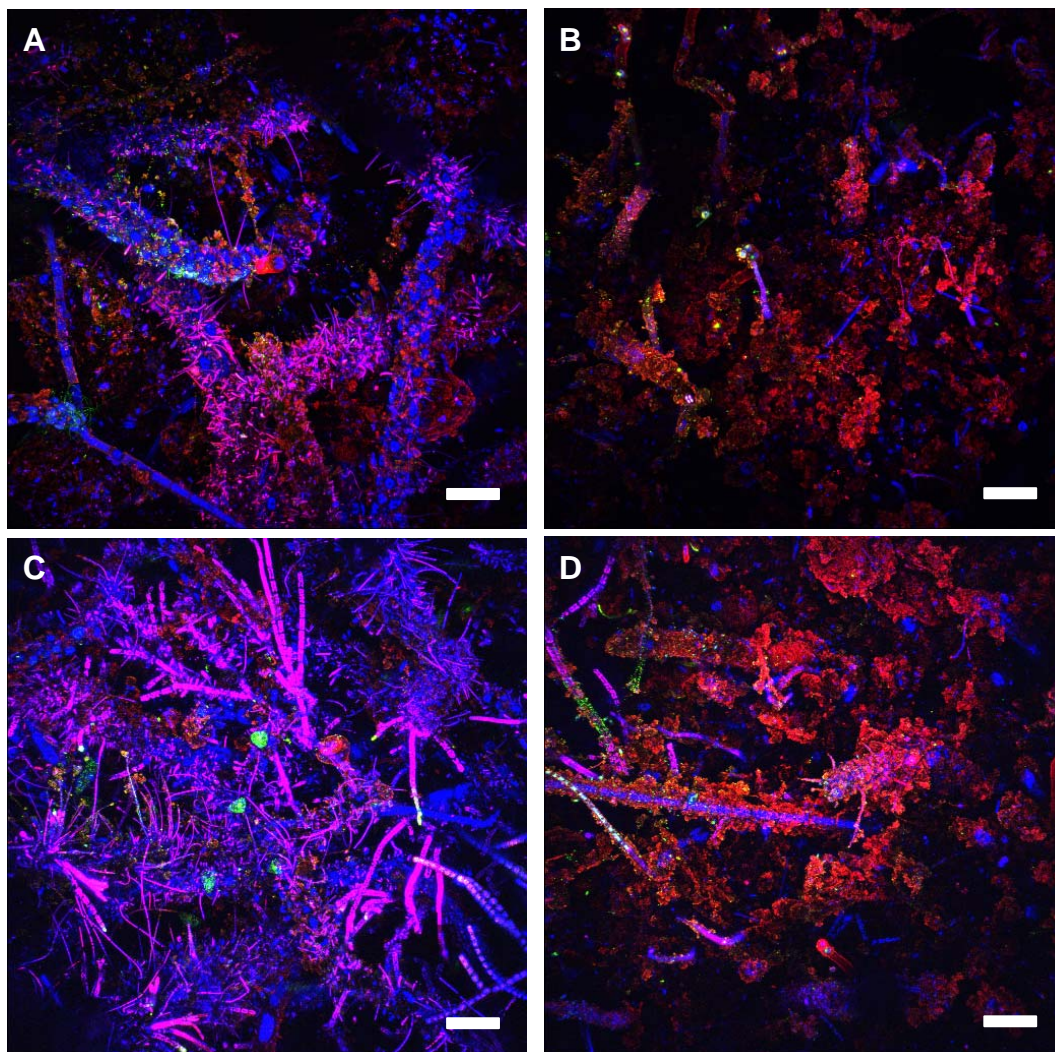


Abb. 3-38 CLSM-Bilder von Biofilmen gewachsen auf Muschelschalen in der Flussmitte (A) bzw. am Flussrand (B) sowie auf Holz in der Flussmitte (C) bzw. am Flussrand (D); Farbliche Zuordnung: siehe Abb. 3-10; Balken entspricht 100 µm

Biofilme aus der Flussmitte, gewachsen bei hoher Fließgeschwindigkeit, zeigten einen höheren Gehalt an photoautotrophen Mikroorganismen als Biofilme vom Flussrand. Dies zeigte sich sowohl bei den auf Holz gewachsenen Biofilmen als auch bei den Biofilmen auf den Muschelschalen. Biofilme vom Flussrand wiesen einen sehr hohen prozentualen Anteil an Glykokonjugaten von durchschnittlich ca. 40 % des gesamten detektierten Biofilmvolumens auf (Abb. 3-39). Zwischen den auf Holz und den auf Muscheln gewachsenen Biofilmen zeigten sich bei den mikroskopischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede in der Biofilmzusammensetzung.

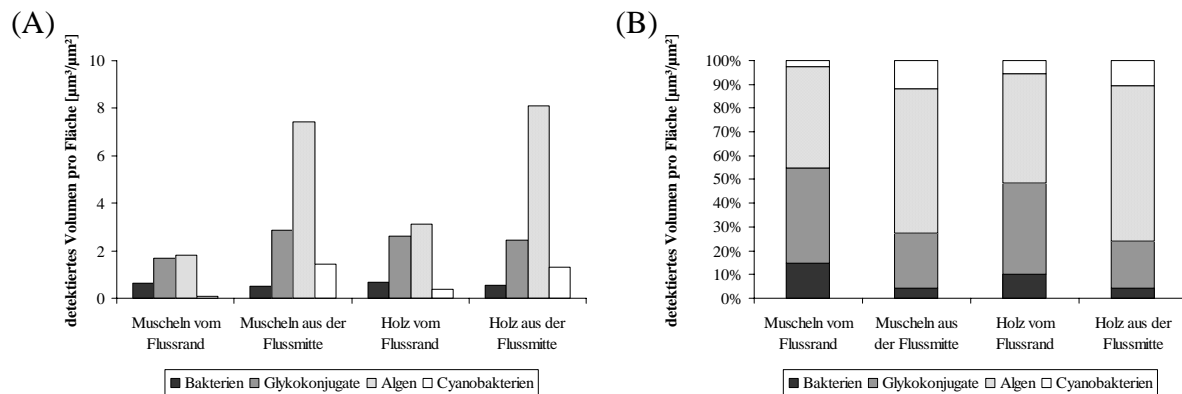


Abb. 3-39 Vergleich der detektierten Biovolumen von Bakterien, Glykokonjugaten, Algen und Cyanobakterien (A) und ihrer prozentualen Anteile am gesamten detektierten Volumen des benthischen Biofilms gewachsen auf verschiedenen Substraten und unter verschiedenen Fließgeschwindigkeiten

Auch die Sauerstoffprofile der Biofilme beider Standorte zeigten deutliche Unterschiede, während die Profile zwischen den verschiedenen Substrata vergleichbar waren (Abb. 3-40). Die Biofilme gewachsen auf Holz und Muscheln in der Flussmitte zeigten einen starken Anstieg der Sauerstoffkonzentration bis zu 18 bzw. 20 mg/l über eine Biofilmtiefe von 800 μm . Trotz eines geringeren Volumens an Algen und Cyanobakterien auf den Muscheln wurden hier höhere Sauerstoffkonzentrationen ermittelt. Auch die aus den Sauerstoffprofilen ermittelten Massestromdichten (Tabelle 3-11) sind bei den Muscheln erheblich höher. Dies könnte durch eine höhere Biomasse von heterotrophen Mikroorganismen in tieferen Biofilmschichten bei auf Holz gewachsenen Biofilmen verursacht worden sein. Bakterien und Pilze finden durch eine wahrscheinlich höhere Konzentration von organischem Material im Holz bessere Nährstoffbedingungen als auf der Oberfläche der Muschelschalen. Auch in den Biofilmen gewachsen am Flussrand wurden die höheren Sauerstoffkonzentrationen und höheren Massestromdichten in den Biofilmen auf den Muschelschalen gefunden. In den Biofilmen vom Flussrand wurden wesentlich geringere Sauerstoffkonzentrationen von ca. 10 bis 12 mg/l gemessen. Der geringe Anstieg der Sauerstoffkonzentration erfolgte bei den Muschelbiofilmen bis in eine Biofilmtiefe von 250 μm . Bei den auf Holz gewachsenen Biofilmen wurde die höchste Sauerstoffkonzentration oft schon an der Biofilmoberfläche gemessen, danach sank die Konzentration bis zur Substratoberfläche immer weiter ab. Bei diesen Biofilmen wurde die niedrigste Massestromdichte gefunden.

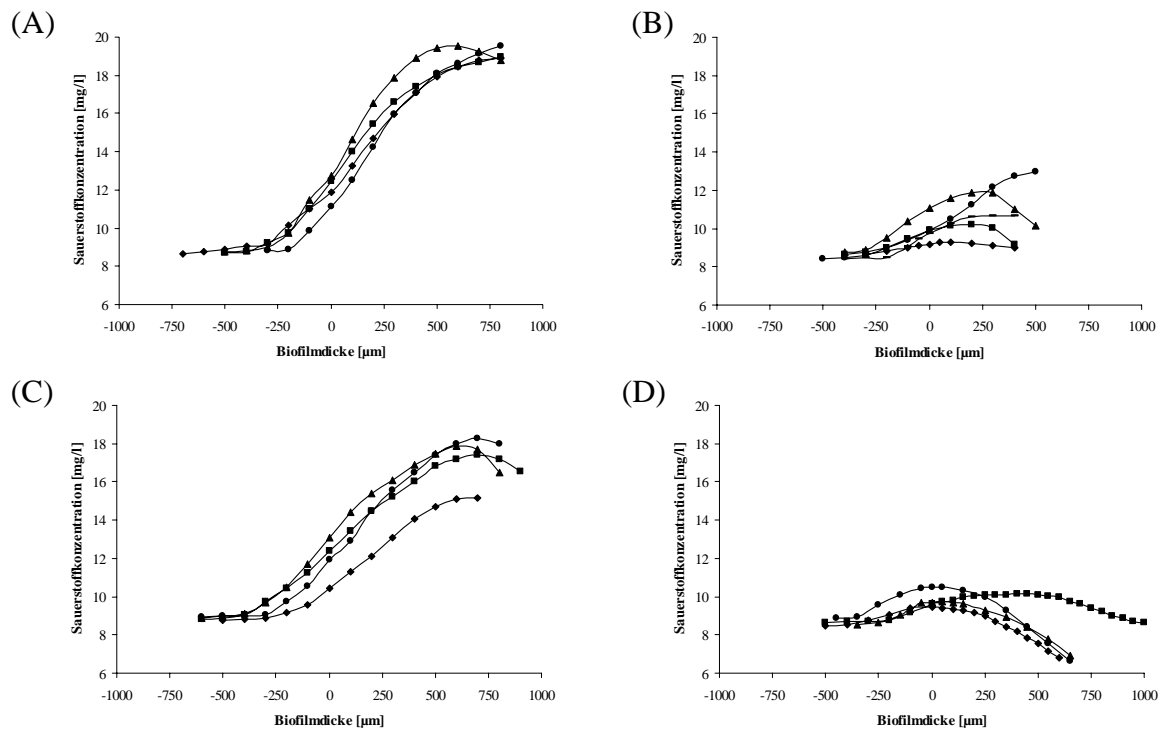


Abb. 3-40 Tiefenprofile der Sauerstoffkonzentration in Biofilmen auf Muscheln aus der Flussmitte (A) und vom Flussrand (B) bzw. Holz aus der Flussmitte (C) und vom Flussrand (D) gemessen mit Sauerstoffmikroelektroden in einer Fließzelle bei gleicher Fließgeschwindigkeit

Tabelle 3-11 mittlere Massestromdichten von Biofilmen gewachsen auf Holz bzw. Muscheln sowie Standardabweichungen, niedrigste sowie höchste ermittelte Massestromdichte

	j [g/m ² d]	+/-	min	max
Muschel vom Flussrand	1,16	0,17	0,92	1,29
Muschel von der Flussmitte	3,22	0,39	2,87	3,66
Holz vom Flussrand	0,96	0,24	0,7	1,16
Holz von der Flussmitte	2,29	0,35	1,87	2,62

Neben der Sauerstoffkonzentration wurde in jeder Biofilmschicht mit Hilfe der „light-dark-shift“ Methode die photosynthetische Aktivität ermittelt (**Abb. 3-41**). Auch hier zeigten sich die gleichen Unterschiede zwischen den beiden Fließgeschwindigkeiten wie bei den mikroskopischen Untersuchungen und den Sauerstoffprofilmessungen. Hohe Photosyntheseaktivität zeigten die in der Flussmitte gewachsenen Biofilmen. Die auf Holz gewachsenen Biofilme wiesen eine höhere Photosyntheserate auf, welche auf Grund der höheren Biomassen der photoautotrophen Mikroorganismen zu erklären ist. Da trotz höherer Photosyntheseraten niedrigere Sauerstoffkonzentrationen als in den auf den Muschelschalen gewachsenen Biofilmen gemessen wurden, muss die Respiration in diesen Biofilmen wesentlich höhere sein. Dies weist auf eine höhere Konzentration von heterotrophen Mikroorganismen in dem auf Holz gewachsenen Biofilmen hin.

Die gemessenen Photosyntheseraten in den Biofilmproben vom Flussrand sind deutlich geringer gegenüber denen aus der Flussmitte.

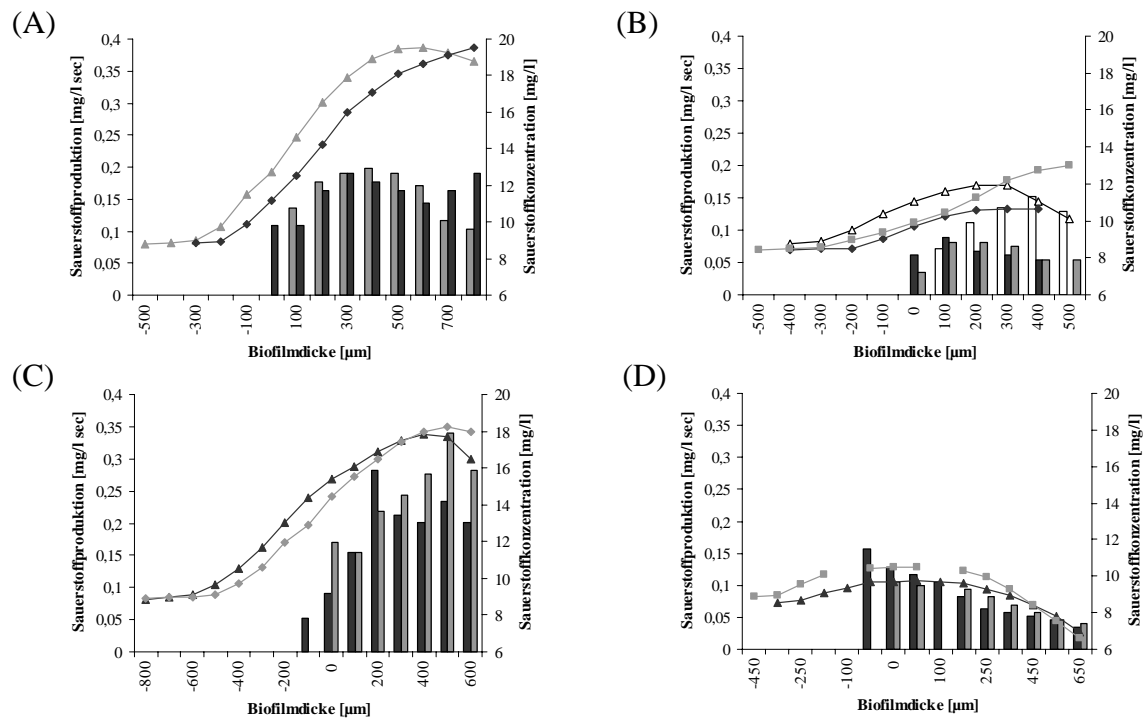


Abb. 3-41 Darstellung der Photosyntheseraten und der Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Schichten der Biofilme auf Muscheln aus der Flussmitte (A) und vom Flussrand (B) bzw. Holz aus der Flussmitte (C) und vom Flussrand (D) gemessen mit Sauerstoffmikroelektroden in einer Fließzelle bei gleicher Fließgeschwindigkeit

3.4 Modellierung mit AQUASIM

3.4.1 Simulation der jahreszeitlichen Entwicklung von Fließgewässerbiofilmen

Die Entwicklung des benthischen Biofilm in einem Fließgewässer konnte mit Hilfe des Simulationsprogramms AQUASIM modelliert werden. Der Biofilm besteht in diesem Modell aus den Komponenten Bakterien, photoautotrophe Mikroorganismen und Glykokonjugaten (inertes Material). Von den im Wasser gelösten Stoffen wurden nur die Sauerstoffkonzentration und die gelösten organischen Substanzen in das Modell einbezogen. Für die Mikroorganismen wurden die Prozesse Wachstum und Respiration formuliert, die von verschiedenen Parametern beeinflusst werden, z.B. der Temperatur, Sauerstoffkonzentration, Lichtbedingungen (**Tabelle 3-12** und **Tabelle 3-13**).

Tabelle 3-12 Prozessmatrix des verwendeten Biofilmmodells

Prozess	gelöste Komponenten		partikuläre Komponenten			Prozessrate
	c _{O2}	c _S	X _H	X _{Photo}	X _{inert}	
Algen						
Wachstum und Photosynthese	1,3	-	-	1	0,1	$\mu_{\text{Photo}} * X_{\text{Photo}} * e^{(0,046 * (\text{Temp} - \text{Temp}_{20}))} * I_{\text{Licht}}$
Respiration	-0,6	-	-	-1	-	$k_{\text{resp_Photo}} * X_{\text{Photo}} * e^{(0,046 * (\text{Temp} - \text{Temp}_{20}))} * (c_{\text{O2}} / (K_{\text{O2}} + c_{\text{O2}}))$
Bakterien						
Wachstum	-0,85	-1,9	1	-	0,1	$\mu_{\text{H}} * X_{\text{H}} * e^{(0,07 * (\text{Temp} - \text{Temp}_{20}))} * (c_{\text{S}} / (K_{\text{S}} + c_{\text{S}})) * (c_{\text{O2}} / (K_{\text{O2}} + c_{\text{O2}}))$
Respiration	-0,77	-	-	-	-	$k_{\text{resp_H}} * X_{\text{H}} * e^{(0,07 * (\text{Temp} - \text{Temp}_{20}))} * (c_{\text{O2}} / (K_{\text{O2}} + c_{\text{O2}}))$

Die Simulation startet im April mit dem Ausbringen der Aufwuchsträger. Die Wassertemperatur im Modellreaktor ändert sich im Verlauf des simulierten Jahres entsprechend der Monatsmittelwerte des Jahres 2000 im Fluss Ehle (**Tabelle 3-13**). Der im Modell integrierte Lichtfaktor (I_{Licht}) wurde aus der Sonnenscheindauer (gemessen vom DWD in Magdeburg) bestimmt. Dadurch kann der jahreszeitliche Unterschied in der Globalstrahlung berücksichtigt werden. Diese Sonnenscheindauer wurde auf den Tag umgerechnet (**Tabelle 3-13**). Somit wird im Modell davon ausgegangen, dass außerhalb der Sonnenscheindauer nicht genügend Licht für ein Algenwachstum und für eine nennenswerte Sauerstoffproduktion vorhanden ist.

Tabelle 3-13 Modellparameter für Temperatur, Lichtfaktor (I_{Licht}) und Grazingfaktor

Monat	Tage	Wassertemperatur	I _{Licht}	Grazingfaktor (k _G)
April	0 - 30	9	0,233	1
Mai	31 - 61	13,3	0,309	$e^{(I_{\text{G}} * (\text{Temp} - \text{Temp}_{\text{M}}))}$
Juni	62 - 91	13,5	0,294	$e^{(I_{\text{G}} * (\text{Temp} - \text{Temp}_{\text{M}}))}$
Juli	92 - 122	14,6	0,305	$e^{(I_{\text{G}} * (\text{Temp} - \text{Temp}_{\text{M}}))}$
August	123 - 153	15	0,291	$e^{(I_{\text{G}} * (\text{Temp} - \text{Temp}_{\text{M}}))}$
September	154 - 183	12,2	0,199	$e^{(I_{\text{G}} * (\text{Temp} - \text{Temp}_{\text{M}}))}$
Oktober	184 - 214	12,1	0,154	$e^{(I_{\text{G}} * (\text{Temp} - \text{Temp}_{\text{M}}))}$
November	215 - 244	8,6	0,085	1
Dezember	245 - 275	4,4	0,065	1
Januar	276 - 306	3,1	0,080	1
Februar	307 - 334	5,4	0,121	1
März	335 - 365	5,1	0,153	1
April	366 - 380	9	0,233	1

Der Biomasseabtrag wurde über eine Abtragsfunktion an die Wachstumsgeschwindigkeit u_F (**Gleichung 2-8**) des Biofilms gekoppelt (**Gleichung 2-18**). Das Wachstum des benthischen Biofilms kann am Beginn, d.h. bei der Anfangsbesiedlung, für kurze Zeit durch eine exponentielle Funktion beschrieben werden. Ein uneingeschränktes oder nur linear begrenztes Biofilmwachstum kann im Fließgewässer über längere Zeit nicht beobachtet werden. Mit zunehmender Biofilmdicke steigt der Biomasseabtrag erheblich an. Aus diesem Grund wurde der Biomasseabtrag an die Biofilmdicke gekoppelt (**Gleichung 3-1**).

$$\frac{\partial LF}{\partial t} = u_F * \frac{LF}{LF_{\max}} \quad [\text{Gleichung 3-1}]$$

LF_{\max} ist die maximal mögliche Biofilmdicke. Die mikroskopischen Untersuchungen der Ehle-Biofilme zeigten, dass die maximal erreichte Biofilmdicke bei ca. 2000 μm lag. Im Modell wurde aus diesem Grund $LF_{\max} = 2000 \mu\text{m}$ angenommen. Jegliches Biofilmwachstum größer LF_{\max} führt zum Biomasseabtrag. Diese Abtragsfunktion bewirkt, dass der Biomasseabtrag bei einer geringen Biofilmdicke sehr klein ist. Mit Zunahme der Biofilmdicke steigt auch der Biomasseabtrag. Die Dicke des Biofilms wird dadurch auf LF_{\max} begrenzt. Mit dieser Abtragsfunktion kann die Anfangsbesiedlung des Ehle-Biofilms sehr gut simuliert werden (**Abb. 3-42 C**). In den ersten 10 Tagen findet ein unbeschränktes exponentielles Biofilmwachstum statt. Erst nach dieser Zeit kommt es zu einem geringen Biomasseabtrag (**Abb. 3-42 D**). Mit zunehmender Biofilmdicke steigt schließlich auch der Biomasseabtrag.

Die Simulation der Anfangsbesiedlung stimmt mit den Beobachtungen und den ermittelten Biofilmdicken in der Ehle überein. Nach Ausbringen der Aufwuchsträger im April kam es zu einer schnellen Besiedlung der Objektträger durch Algen und Bakterien. Nach nur wenigen Tagen entwickelte sich schon ein sehr komplexer dicker Biofilm.

Mit steigender Wassertemperatur am Ende des Frühlings nimmt die Anzahl von Makrozoobenthos-Arten erheblich zu. Vielen von ihnen dient der Biofilm als Nahrungsgrundlage. Dadurch besitzt das Makrozoobenthos in Fließgewässern einen erheblichen Einfluss auf die Biofilmdicke. Während der Sommermonate kann es durch das Abweiden des Biofilms zu einer erheblichen Reduzierung der Biofilmdicke kommen. Da nur unzureichende Angaben zur Entwicklung des Makrozoobenthos existieren, wurde darauf verzichtet, das Makrozoobenthos als Organismengruppe mit ins Biofilmmodell einzubinden. Stattdessen wurde der Biomasseabtrag durch das Makrozoobenthos über einen Grazingfaktor (k_G) in der Abtragsfunktion beschrieben (**Gleichung 3-2**).

$$\frac{\partial LF}{\partial t} = u_F * \frac{LF}{LF_{\max}} * k_G \quad [\text{Gleichung 3-2}]$$

Die Entwicklung des Makrozoobenthos ist an die Wassertemperatur des Fließgewässers gebunden. Im Biofilmmodell wird davon ausgegangen, dass erst bei einer Wassertemperatur von 10 °C das Makrozoobenthos aktiv wird. Für alle Monate mit einer durchschnittlichen Wassertemperatur unter 10 °C ist der Grazingfaktor gleich 1. Damit findet in diesen Monaten kein zusätzlicher Biomasseabtrag durch Grazer statt. In den Monaten mit einer durchschnittlichen Wassertemperatur über 10 °C wird der Grazingfaktor durch die **Gleichung 3-3** beschrieben. Der Grazingfaktor ist auch in diesem Zeitraum an die Temperatur gekoppelt.

$$k_G = e^{(I_G * (Temp - Temp_M))} \quad [\text{Gleichung 3-3}]$$

Temp ist dabei die tatsächliche Temperatur und Temp_M ist die Temperatur ab der das Makrozoobenthos aktiv wird. Der Faktor I_G gibt die Intensität des Grazings an, da in den

verschiedenen Fließgewässern sehr unterschiedliche Abundanzen von grazenden Makrozoobenthosarten auftreten. Somit kann der Grazingfaktor an die Bedingungen in den einzelnen Fließgewässern angepasst werden. I_G kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Bei einem Wert von 0 tritt kein Biomasseabtrag durch Grazing auf. In diesen Fließgewässern ist die Anzahl an Makrozoobenthosorganismen so gering, dass kein Einfluss auf den Biofilm messbar ist. Besitzt I_G einen Wert von 1 ist eine hohe Abundanz von grazenden Makrozoobenthosarten vorhanden. Für die Simulation der Biofilmentwicklung in der Ehle wurde der Faktor I_G mit 1 angenommen, da ein sehr starker Einfluss des Makrozoobenthos auf den Biofilm beobachtet wurde. In **Abb. 3-42 A und B** ist die Veränderung der Wassertemperatur während der Simulation und die daraus abgeleiteten Grazing-Faktoren mit $I_G = 1$ für die einzelnen Jahreszeiten dargestellt.

Aufgrund der durchschnittlichen Monatsmitteltemperatur des Flusswassers über 10 °C im Mai steigt der Grazing-Faktor erheblich an und somit auch der Biomasseabtrag. 10 Tagen nach Anstieg der Temperatur über 10 °C und Beginn des Grazings ist nur noch ein Zehntel der Biomasse vorhanden (**Abb. 3-42 C**). Während der gesamten Sommermonate kommt es durch den regelmäßigen Biomasseabtrag durch die Makrozoobenthosorganismen zu keiner Zunahme der Biofilmdicke.

Mit abnehmender Temperatur im September, verringert sich auch die Anzahl an Makrozoobenthosorganismen und damit der Grazingdruck. Trotzdem der Grazing-Faktor Mitte September schon stark abgenommen hat, kommt es nicht gleich zu einem starken Algenwachstum. Das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen ist durch die Abnahme des Lichtfaktors gehemmt. Die geringe Zunahme der Biofilmdicke in der Simulation erfolgt vor allem auf Grund des Wachstums von Bakterien. Erst nachdem Anfang November die durchschnittliche Wassertemperatur unter 10 °C gesunken und dadurch der Grazing-Faktor gleich 1 ist, kommt es zu einer Zunahme der Algenfraktion und zu einem kontinuierlichen Anstieg der Biofilmdicke (**Abb. 3-42 C**). Mit zunehmender Biofilmdicke kommt es auch wieder zu einer Zunahme des Abtrages an Biomasse durch Abrasion und Erosion (**Abb. 3-42 D**). Das Gesamtwachstum ist gegenüber dem Frühjahr wesentlich geringer. Nachdem kein Grazing mehr auftritt benötigt der Biofilm fast 100 Tage bis zum Erreichen der maximalen Biofilmdicke. Das Wachstum der Bakterien und Algen wird vor allem durch die geringen Temperaturen aber auch durch die geringe Sonnenscheindauer begrenzt. Die Abtragsraten steigen durch die Zunahme der Biofilmdicke kontinuierlich an.

Während der Wintermonate bis einschließlich April werden die höchsten Biofilmdicken ermittelt. Durch die Zunahme der Sonnenscheindauer und damit des Lichtfaktors sowie der Wassertemperatur steigen die Wachstumsraten in Frühjahr an. Dadurch kommt es wieder zu einem erhöhten Biomasseabtrag, da die maximale Biofilmdicke schon Ende Januar erreicht wurde (**Abb. 3-42**).

Anfang Mai kommt es wiederum zu einer starken Abnahme der Biofilmdicke hervorgerufen durch die Zunahme der Makrozoobenthosaktivität. Die gemessenen Biofilmdicken stimmen gut mit der Simulation überein. Die Messwerte stammen aus der 1. und 2. Versuchsreihe der Ehle-Untersuchungen. Während der Monate Dezember bis April wurde die Biofilmdicken an Biofilmbruchkanten unter dem Mikroskop bestimmt, da bei den Routineuntersuchungen nicht der gesamte Biofilm gescannt werden konnte.

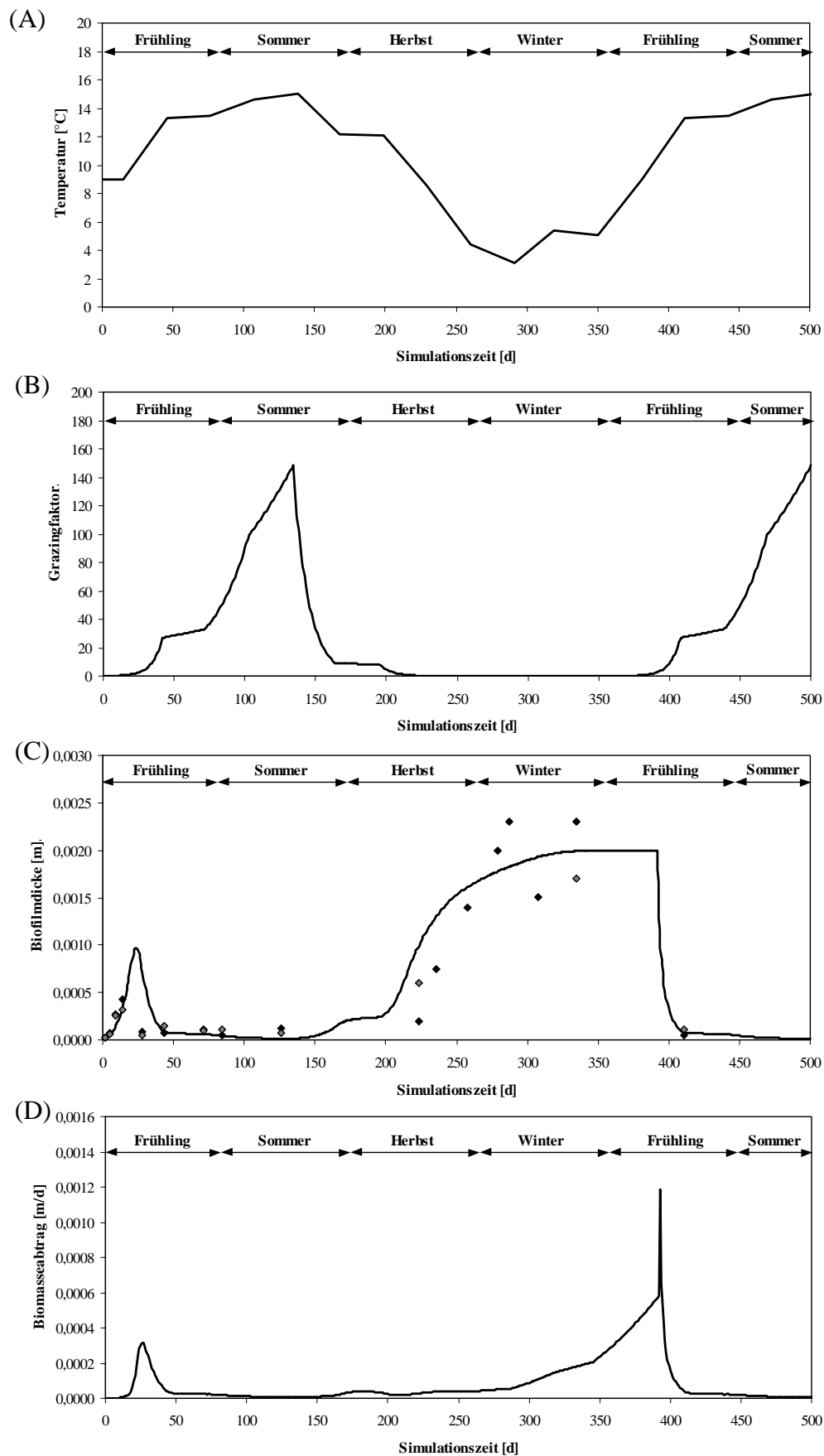


Abb. 3-42 Änderung der Biofilmdicke über einen Zeitraum von 500 Tagen, Startzeit entspricht dem 05.04.2000. Simulierte Ergebnisse sind durch eine schwarze Linie dargestellt. Messwerte der 1. und 2. Versuchsreihe sind als schwarze (Ehle 02) und graue (Ehle 04) Punkte dargestellt.

Durch die Änderung der Grazingintensität I_G kann die Abtragsfunktion an die vorherrschenden Bedingungen im Fließgewässer angepasst werden. Dabei muss jeweils die Individuenanzahl aller grazenden Arten sowie das Nahrungsangebot berücksichtigt werden. In **Abb. 3-43** ist die Änderung der Biofilmdicke mit verschiedenen Grazingintensitäten zwischen 0 und 1 dargestellt. Mit abnehmender Grazingintensität nimmt die Biofilmdicke während der Sommermonate zu. Der Anstieg der Biofilmdicke nach dem Ausbringen der Proben-träger kann sich jedoch durch eine geringere Temperatur z.B. in Gebirgsflüssen verringern.

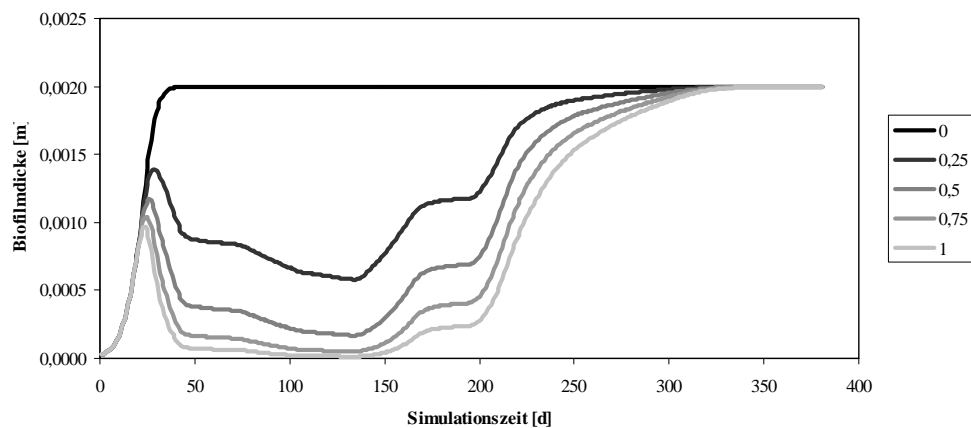


Abb. 3-43 Änderung der simulierten Biofilmdicke mit verschiedenen Grazingintensitäten zwischen 0 und 1 im Verlauf eines Jahres; Start der Simulation Anfang April

3.4.2 Simulation der Sauerstoffkonzentrationsprofile und der photosynthetischen Aktivität im benthischen Biofilm

Von den kanadischen Biofilmen aus dem South-Saskatchewan-River wurden die Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Biofilmschichten sowie die Sauerstoffproduktion durch photosynthetische Aktivität simuliert. Dafür wurden die aus den CLSM-Bildern ermittelten Volumen der einzelnen Biofilmkomponenten aus jeder Biofilmschicht in das Biofilmmodell AQUASIM implementiert und mit den Sauerstoffkonzentrationsprofilen und den Photosyntheseraten aus den Mikroelektrodenmessungen kombiniert. Für den hier betrachteten Biofilm wurden nur die photoautotrophen Mikroorganismen (Algen und Cyanobakterien) und die inerte Biomasse berücksichtigt. Die Bakterien können in der Simulation auf Grund ihres geringen Volumenanteils vernachlässigt werden. Somit wurden nur die photosynthetische Sauerstoffproduktion sowie die Respiration der photoautotrophen Mikroorganismen als Prozesse ins Modell integriert (**Tabelle 3-14**).

Tabelle 3-14 Prozessmatrix für die Simulation der Sauerstoffkonzentrationen und der photosynthetischen Aktivität im benthischen Biofilm (stationärer Modellansatz $dX/dt = 0$)

gelöste Komponenten		
Prozess	c _{O2}	Prozessrate
Algen		
Photosynthese	1,3	$\mu_{\text{Photo}} * X_{\text{Photo}} * e^{(0,046 * (\text{Temp} - \text{Temp}_{20}))} * \text{Licht}_{\text{on/off}}$
Respiration	-0,6	$k_{\text{resp}} * X_{\text{Photo}} * e^{(0,046 * (\text{Temp} - \text{Temp}_{20}))} * (c_{\text{O2}} / (K_{\text{O2}} + c_{\text{O2}}))$

Für die Simulation wurden die Volumenanteile der partikulären Komponenten pro Biofilmschicht errechnet und als Basisinformation ins Programm integriert (**Abb. 3-44**). Das höchste detektierte Biovolumen wurde bei den Biofilmen gewachsen auf Holz in der Flussmitte ermittelt. Für die Biofilmschicht mit dem höchsten Biovolumen wurde für die feste Phase ein Volumenanteil von 0,10 angenommen und im Verhältnis dazu alle Volumenanteile der photoautotrophen Mikroorganismen berechnet. Da im Simulationsprogramm der Volumenanteil der festen Phase in allen Biofilmschichten konstant sein muss, wurde die Differenz als inertes Material definiert. Anteilig zum Volumen des auf Holz aus der Flussmitte gewachsenen Biofilm verändert sich der Volumenanteil der festen Bestandteile in allen anderen Biofilmproben, da dort ein geringeres Biovolumen ermittelt wurde. Für den auf Muscheln in der Flussmitte gewachsenen Biofilm ergab sich daraus ein Volumenanteil der festen Bestandteile von 0,082, für den auf Muschel am Flussrand gewachsenen Biofilm ein Anteil von 0,032 und den auf Holz am Flussrand gewachsenen Biofilm von 0,040. In **Abb. 3-44** sind die daraus resultierenden Volumenanteile pro Biofilmschicht und Biofilmprobe dargestellt. Die maximale Biofilmdicke wurde auf 0,0019 m festgesetzt, wobei 0 m die Substratoberfläche und 0,0019 m die Biofilmoberfläche darstellen. Mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop konnten photoautotrophe Mikroorganismen bis in eine Tiefe von maximal 0,0011 m detektiert werden. Der Biofilm wurde in Schichten von 0,00005 m unterteilt und die detektierten Volumen berechnet.

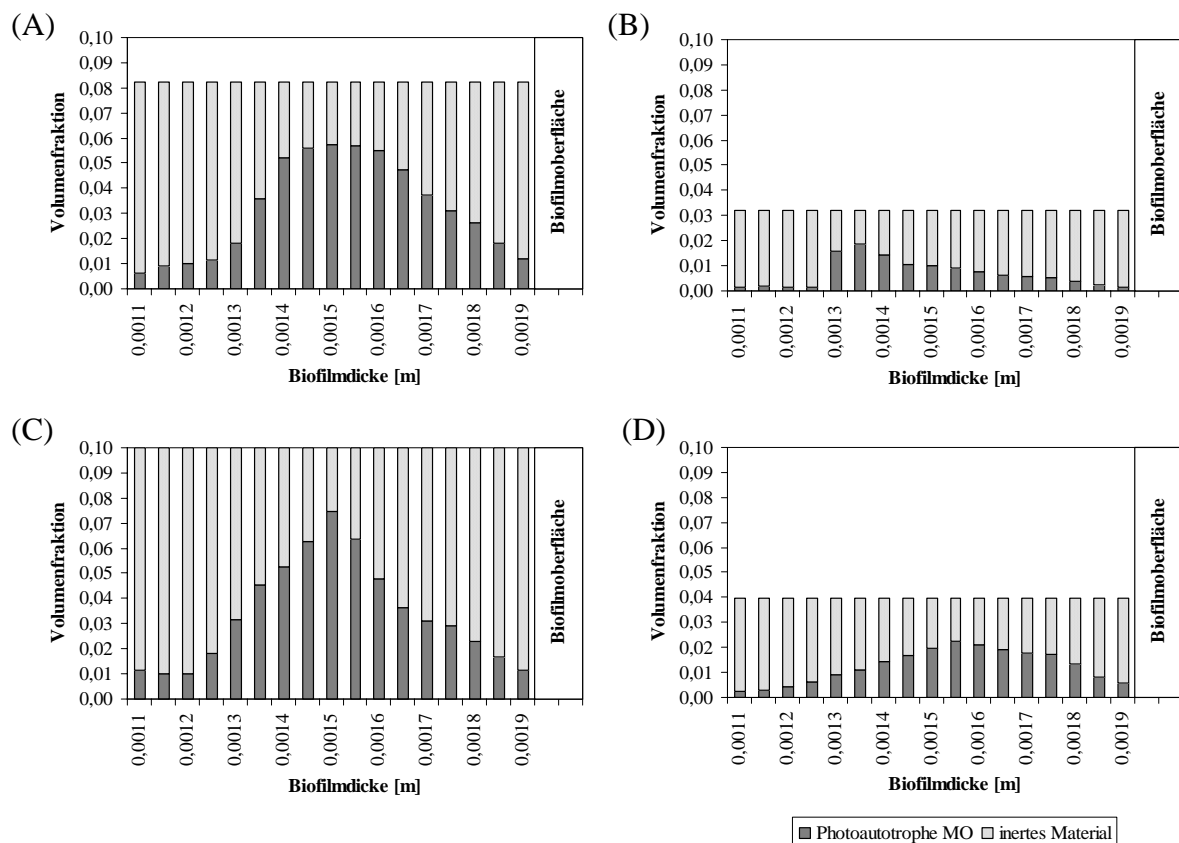


Abb. 3-44 Volumenfraktion der festen Biofilmbestandteile (photoautotrophe Biomasse und inerte Biomasse) in den kanadischen Biofilmen gewachsen auf Muscheln in der Flussmitte (A) und am Flussrand (B) bzw. auf Holz in der Flussmitte (C) und am Flussrand (D)

Der Stoffübergangskoeffizient wurde für jeden Biofilm aus den Sauerstoffprofilen mit Hilfe von **Gleichung 2-10** abgeschätzt (**Tabelle 3-15**). Die Werte der verschiedenen Biofilmproben unterschieden sich nur geringfügig.

Tabelle 3-15 Mittlerer Stoffübergangskoeffizient errechnet aus den Sauerstoffkonzentrationsprofilen, seine Standardabweichung sowie der minimal und maximal ermittelte Wert

	β [m/s]	+/-	min	max
Muschel von der Flussmitte	$1,33 \cdot 10^{-5}$	$0,11 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$	$1,47 \cdot 10^{-5}$
Muschel vom Flussrand	$1,12 \cdot 10^{-5}$	$0,22 \cdot 10^{-5}$	$0,82 \cdot 10^{-5}$	$1,34 \cdot 10^{-5}$
Holz von der Flussmitte	$0,94 \cdot 10^{-5}$	$0,12 \cdot 10^{-5}$	$0,84 \cdot 10^{-5}$	$1,10 \cdot 10^{-5}$
Holz vom Flussrand	$1,18 \cdot 10^{-5}$	$0,16 \cdot 10^{-5}$	$0,10 \cdot 10^{-5}$	$1,28 \cdot 10^{-5}$

Für eine optimale Simulation der Sauerstoffkonzentrationen und der Photosyntheseraten mussten die errechneten Stoffübergangskoeffizienten nur geringfügig angepasst werden. Alle im Biofilmmodell angepassten Koeffizienten sind in **Tabelle 3-16** aufgelistet. Der Photosynthesekoeffizient μ_{Photo} war für alle Biofilmproben gleich, wohingegen der Respirationskoeffizient bei den Biofilmen gewachsen auf Holz am Flussrand wesentlich über denen der anderen lag. Unter Berücksichtigung der Ertragskoeffizienten wurde für die Biofilmproben ein Sauerstoffverbrauch durch Respiration von ca. 39 bis 43 % von der Sauerstoffproduktion durch Photosynthese errechnet, ausgenommen davon sind die Biofilme gewachsen auf Holz vom Flussrand. Hier lag der Anteil der Respiration an der Photosynthese bei 67 %.

Tabelle 3-16 Im Biofilmmodell verwendete Stoffübergangskoeffizienten, Respirationskoeffizienten und Wachstumskoeffizienten sowie der mit Hilfe der Ertragskoeffizienten ermittelte Anteil der Respiration an der Photosynthese,

	β [m/s]	k_{resp} [1/s]	μ_{Photo} [1/s]	Anteil der Respiration an der Photosynthese
Muschel von der Flussmitte	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	38,5 %
Muschel vom Flussrand	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	42,5 %
Holz von der Flussmitte	$0,94 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	42,5 %
Holz vom Flussrand	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	66,5 %

Mit diesen Parametern und der ermittelten Biovolumen aus den CLSM-Bildern konnten die Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Biofilmschichten und Biofilmproben sehr gut abgebildet werden (**Abb. 3-45 A, C, E, G**). Die dargestellten Profile spiegeln die Sauerstoffsituation in den Biofilmschichten bei optimalen Lichtbedingungen unter Berücksichtigung der gemessenen photoautotrophen Biomasse wider. Die heterotrophe Biomasse wurde auf Grund ihres geringen Volumens vernachlässigt. Die simulierten Sauerstoffkonzentrationsprofile stimmen mit den gemessenen Konzentrationen überwiegend überein. Nach 1400 Sekunden wurde in der Simulation die Lichtintensität auf 0 gesetzt, so dass keine Sauerstoffproduktion mehr stattfand. Die Änderung der Sauerstoffkonzentrationen ist in **Abb. 3-45 B, D, F, H** dargestellt. Die experimentell ermittelten Sauerstoffkonzentrationsabnahmen nach dem Ausschalten des Lichtes sind ebenfalls in den Abbildungen dargestellt. Durch diesen Vergleich kann kontrolliert werden, ob die photosynthetische Aktivität in der Simulation den wirklichen Aktivitäten annähernd entspricht. Die simulierten sowie die gemessenen Sauerstoffkonzentrationsabnahmen der Biofilmproben aus der Flussmitte stimmen gut überein. Bei den Biofilmproben vom Flussrand wurde die photosynthetische Aktivität in der Simulation etwas unterschätzt (**Abb. 3-45 D, H**).

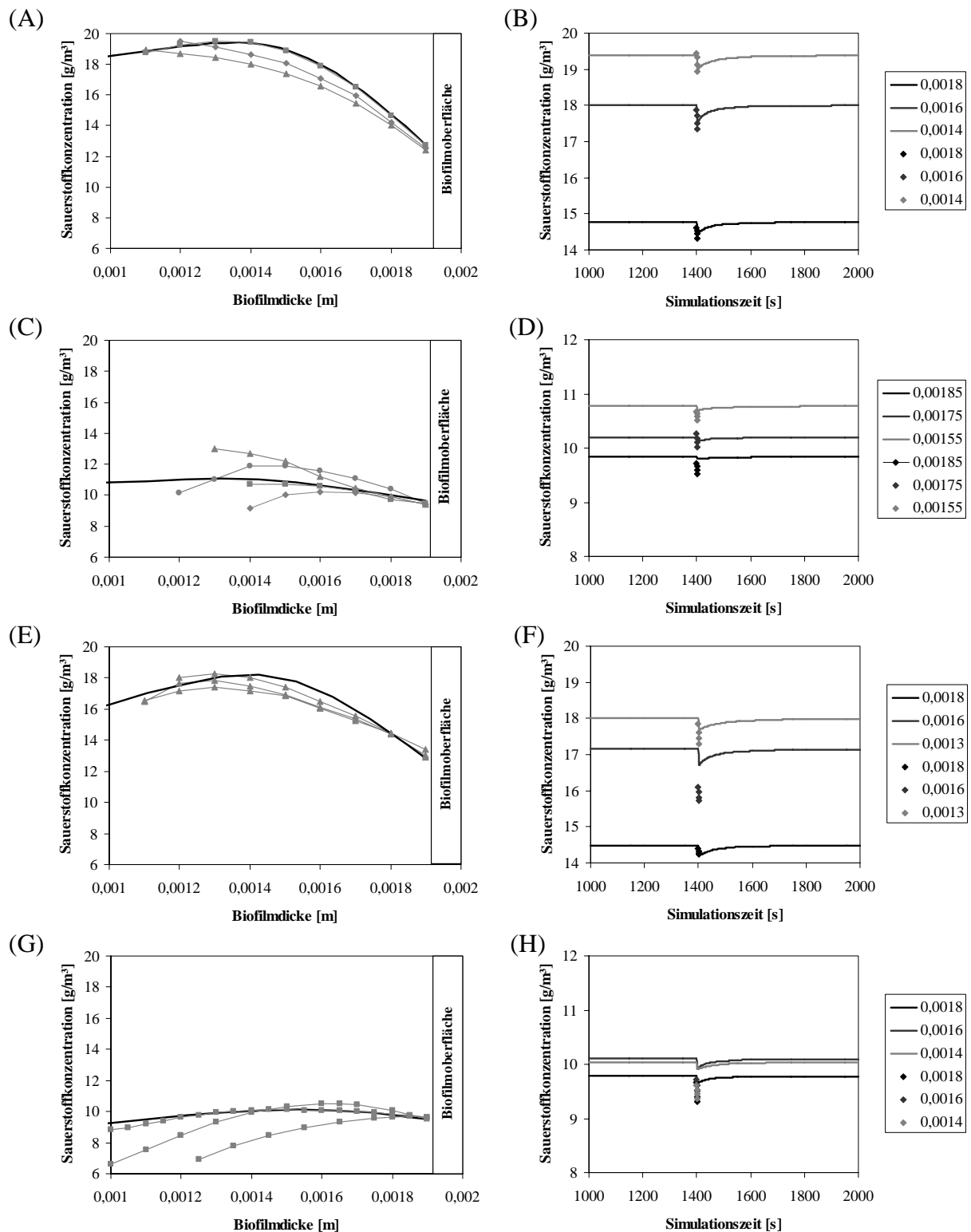


Abb. 3-45 Simulierte (Linien) sowie gemessene (Punkte) Sauerstoffkonzentrationsprofile im benthischen Biofilm gewachsen auf Muschelschalen in der Hauptströmung (A) und am Flussrand (C) sowie gewachsen auf Holz in der Hauptströmung (E) und am Flussrand (G) sowie die Änderung der Sauerstoffkonzentrationen in verschiedenen Biofilmtiefen nach Ausschalten des Lichtes bei einer Simulationszeit von 1400 s (B, D, F, H)

4 Diskussion

4.1 Mikroskopie und Bildanalyse

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie stellt zurzeit die bestmögliche Untersuchungsmethode zur strukturellen Aufklärung von Biofilmsystemen dar, da die natürliche Struktur der Biofilme bei dieser Methode erhalten bleibt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch auch die Grenzen und Schwierigkeiten dieser Methode bei der vollständigen Erfassung aller Biofilmkomponenten. Probleme bereitete vor allem das Anfärben der extrazellulären polymeren Substanzen, welche in Biofilmsystemen eine entscheidende Bedeutung für die Struktur, die Biofilmeigenschaften aber auch für die Lebensbedingungen der Mikroorganismen im Biofilm besitzen (Flemming & Wingender 2001, Flemming & Wingender 2002, Sutherland 2001a, b). Bei vielen Aufnahmen in der Arbeit wurde deutlich, dass manchmal nur ein Teil der Biofilmkomponenten angefärbt werden konnte. Es wird vermutet, dass vor allem der Anteil an extrazellulären Substanzen nur unzureichend angefärbt werden konnte. Jedes Lektin besitzt eine Spezifität für bestimmte Polysaccharide, so dass beim Einsatz von verschiedenen Lektinen unterschiedliche Fraktionen von Glykokonjugaten angefärbt werden und dies auch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann (Neu 2000a, Staudt et al. 2003). So muss bei der Auswertung berücksichtigt werden, dass bei der Verwendung von Lektinen nur eine Lektin-spezifische Fraktion der Glykokonjugate angefärbt wird und dies vielleicht nur einen geringen Teil der gesamten extrazellulären Substanzen darstellt. Das für die Untersuchungen ausgewählte Lektin der Pflanze *Phaseolus vulgaris* färbte bei den Reaktor-Biofilmen im Frühjahr eine große Fraktion der Biofilme an. Nach einigen Wochen nahm der Anteil an Glykokonjugaten in den Reaktorbiofilmen erheblich ab. Während des Biofilmwachstums ändern sich jedoch die Lebensbedingungen sowie die Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft und dadurch auch die Zusammensetzung der extrazellulären Substanzen. Dies könnte die Abnahme der mit dem verwendeten Lektin anfärbbaren Glykokonjugat-Fraktion in den Reaktorbiofilmen erklären, wobei vielleicht das Gesamtvolumen der Glykokonjugatfraktion sich nur gering veränderte. Als Alternative zur mikroskopischen Bestimmung wäre eine Extraktion der extrazellulären Substanzen (Nielsen & Jahn 1999), welche jedoch wesentlich aufwendiger ist und ebenfalls Probleme beinhaltet (Zhang et al. 1999).

Die CLSM bietet die Möglichkeit die Biofilme im hydratisierten Zustand und ohne aufwendiger Präparation zu untersuchen. Dadurch bleibt die natürliche Struktur erhalten und eine korrekte drei-dimensionale Abbildung des Biofilms wird ermöglicht. Diese Methode liefert bei dünnen Biofilmen sowie bei dicken Biofilmen mit einer lockeren Struktur sehr gute Ergebnisse. Bei dicken kompakten Biofilmen, welche in der Ehle von Dezember bis April beobachtet wurden, treten jedoch Probleme auf. Die drei-dimensionalen Darstellungen dieser Ehle-Biofilme zeigten deutlich, dass nur die oberste Biofilmschicht (ca. 100 µm) aufgenommen wurde. Die vertikalen Querschnitte dieser Biofilme, angefertigt mit einem Kryotom, zeigten hingegen eine Biofilmdicke von ca. 1300 µm. Somit wurden die detektierten Volumen der Biofilmkomponenten sowie die aus den CLSM-Bildern ermittelten Biofilmdicken in der Zeit von Dezember bis April bei den Ehle-Biofilmen stark unterschätzt. Für die Untersuchung von solchen dicken und kompakten Biofilmen müssen aus diesem Grund zusätzlich vertikale Querschnitte angefertigt werden, um die gesamte Struktur und damit die korrekte Biofilmmzusammensetzung zu erhalten. Es wird vermutet, dass entweder die Eindringtiefe der Laser begrenzt ist oder aber dass das Fluoreszenzlicht durch die darüber liegenden Schichten abgefangen wurde, da selbst die Autofluoreszenz der Algen aus den tieferen Schichten nicht detektiert werden konnte.

Ein entscheidender Vorteil der CLSM ist die Aufnahme von digitalen Bildern des untersuchten Objektes. Dies ermöglicht eine Bildanalyse zur qualitativen und quantitativen Auswertung sowie eine drei-dimensionale Rekonstruktion des Biofilms (Lawrence et al. 1998b, Lewandowski et al. 1999, Yang et al. 2000, Heydorn et al. 2000b). Für die Analyse von CLSM-Bildern stehen nur wenige Programme zur Verfügung. Durch die Mikroorganismenzusammensetzung der Ehle-Biofilme, insbesondere die hohe Konzentration von Cyanobakterien während der Sommermonate, lieferten die bereits existierenden Bildanalyseprogramme unzureichende und mitunter falsche Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde von der Uni Magdeburg das Programm Microstat zur Quantifizierung von CLSM-Bildstapeln des benthischen Biofilms entwickelt (Bergner et al. 2002). Es berücksichtigt die speziell in Fließgewässern auftretenden Mikroorganismengemeinschaften. Andere Bildanalyseprogramme wie zum Beispiel NIH-Image und Comstat wurden vor allem für die Auswertung von Reaktorbiofilm-Bildern benutzt (Lawrence et al. 1998b), oft auch nur von Reinkulturbiofilmen (Heydorn et al. 2000a). Natürliche Fließgewässerbiofilme besitzen eine wesentlich komplexere Zusammensetzung. Während Cyanobakterien in Reaktorbiofilmen nur eine untergeordnete Rolle spielen, was auch die eigenen Untersuchungen zeigten, traten sie vor allem im Sommer in Fließgewässerbiofilmen verstärkt auf. Die Pigmente der Cyanobakterien fluoreszieren in verschiedenen Wellenlängenbereichen und überlagern sich dadurch oft mit anderen Fluoreszenzsignalen. Nur eine Kollokalisierung der Kanäle ermöglicht die Extraktion der Cyanobakterienfluoreszenzsignale und somit eine korrekte Berechnung aller Volumenparameter.

Das Programm Microstat führt gleich am Anfang eine Kollokalisierung durch. Danach wird den Signalen der Cyanobakterien ein neuer Kanal zugeordnet. Dies sichert eine korrekte Berechnung aller untersuchten Biofilmkomponenten. Außerdem konnte durch die Entwicklung eines neuen Segmentierungsalgorithmus eine verbesserte Segmentierung und Bildauswertung gegenüber herkömmlichen Programmen gewährleistet werden. Andere für die Quantifizierung von Biofilmen verwendeten Analyseprogramme benutzen meist eine Thresholdsegmentierung, überwiegend mit einer manuellen Thresholdeinstellung (Heydorn et al. 2000a, Yang et al. 2000, Hermanowicz et al. 1995). Das neu entwickelte Programm Microstat verwendet einen Wasserscheidenalgorithmus zur Segmentierung (Bergner et al. 2002). Damit ist es möglich, sehr stark fluoreszierende und schwach fluoreszierende Objekte gleich gut segmentieren zu können. Rauschen kann besser herausgefiltert werden, ohne schwach fluoreszierende Objekte zu entfernen. Das Programm benutzt mehrere Schwellenwerte für die Segmentierung. Damit kann das Programm sehr genau an die jeweiligen Bild-Bedingungen angepasst werden. Die verschiedenen Schwellenwerte und die Wasserscheidensegmentierung sorgen für einen geringeren Einfluss des globalen Schwellenwertes gegenüber einer Thresholdsegmentierung. Deshalb war eine Anpassung der einmal ausgewählten Schwellenwerteinstellung bei den sehr unterschiedlichen Biofilmbildern nicht notwendig und konnte für alle CLSM-Bilder in dieser Arbeit beibehalten werden, so dass gefundene Unterschiede zwischen den CLSM-Bildern nicht von unterschiedlichen Segmentierungseinstellungen hervorgerufen wurden.

4.2 Biofilmuntersuchungen

4.2.1 Vergleich von Biofilmen gewachsen auf natürlichen und künstlichen Substraten

Die mikroskopischen Untersuchungen der Biofilme aus der Ehle gewachsen auf Steinen sowie gewachsen auf Polykarbonatobjektträgern zeigten keine auffälligen Unterschiede in der Struktur sowie in der Biofilmzusammensetzung. Standortsspezifische Unterschiede sowie saisonale Veränderungen der Biofilmzusammensetzung und Struktur zeigten sich sowohl auf

den Steinen als auch auf den künstlichen Substraten. Auch die Biofilme gewachsen auf Holz und Muschelschalen aus dem South-Saskatchewan-River zeigten eine hohe Übereinstimmung in Struktur und Zusammensetzung. Bei den ermittelten flächenbezogenen Netto-Photosyntheseraten sowie bei den volumenbezogenen Brutto-Photosyntheseraten konnten geringe Unterschiede zwischen den auf Holz und den auf Muschelschalen gewachsenen Biofilmen gefunden werden. Die Ursache für diese Unterschiede liegt jedoch nicht in den Oberflächeneigenschaften. In Biofilmen gewachsen auf Holz wurden eine höhere Aktivität von Holz abbauenden Enzymen sowie eine höhere Biomasse von Pilzen festgestellt (Sinsabaugh et al. 1991). Dies führt zum einen zu einer besseren Kohlenstoffversorgung und zum anderen zu einer höheren Respiration.

In der Literatur findet man sehr unterschiedliche Ergebnisse zum Einfluss der Aufwuchsoberfläche auf den benthischen Biofilm, wobei dabei vor allem die Diatomen-Zusammensetzung verglichen wurde. Eine ähnliche Zusammensetzung des benthischen Biofilms (in der Literatur meist als Periphyton bezeichnet) auf verschiedenen künstlichen Substraten wie Tonziegel und sterilisierte Steine und auf natürlichen Substraten fanden ebenfalls Tuchman & Stevenson (1980). Auch Lowe & Gale (1980) fanden nur geringe Unterschiede zwischen verschiedenen künstlichen Substraten als Aufwuchsoberfläche. Bei den Untersuchungen von Korte & Blinn (1983) zeigten sich hingegen erhebliche Unterschiede in der Diatomenzusammensetzung zwischen den Aluminium- und Plexiglasoberflächen als künstliche Aufwuchsflächen. Sie untersuchten die Entwicklung jedoch nur über 21 Tage. Einen Einfluss der Oberflächeneigenschaften von verschiedenen Materialien bei der Initialbiofilmentwicklung wird von einigen Wissenschaftlern vermutet. Dieser Einfluss verringert sich jedoch mit zunehmendem Alter der Biofilme und spielt später nur eine untergeordnete Rolle. Die eigenen Untersuchungen wie auch die von Lowe & Gale (1980) zeigten, dass Biofilme gewachsen auf künstlichen Aufwuchsträgern nach längerer Exposition in ihrer Struktur und Zusammensetzung mit denen auf natürlichen Oberflächen aufgewachsenen Biofilmen übereinstimmen.

Neben der Dauer der Exposition besitzt auch die Position der Objektträger eine entscheidende Bedeutung auf die Untersuchungsergebnisse (Lowe & Gale 1980). Deshalb wurden für die Untersuchungen des benthischen Biofilms in der Ehle die Objektträger auf dem Boden des Fließgewässers platziert und die Entwicklung über einen Zeitraum von mehreren Monaten verfolgt. Unterschiedliche Expositionsdauer sowie -methoden sind oft die Ursache für verschiedene Ergebnisse bei Biofilmuntersuchungen. So fand Luttenton et al. (1986) nur eine geringe Ähnlichkeit in der Zusammensetzung des Periphytons auf Glasobjektträgern und auf Makrophyten. Sie hängten ihre Objektträger unterhalb der Wasseroberfläche auf. Cattaneo & Kalff (1979) hingegen verglichen das Periphyton gewachsen auf *Potamogeton* mit morphologisch ähnlichen Plastikpflanzen und fanden nur geringe Unterschiede in Biomasse und Primärproduktion.

Die Biofilme auf den untersuchten Polykarbonatobjektträgern in der Ehle zeigten eine hohe Übereinstimmung in ihrer Struktur und Zusammensetzung zu den Biofilmen auf natürlichen Substraten (Steinen). Für die weiteren Untersuchungen zur Entwicklung von Fließgewässerbiofilmen konnten somit die Biofilme gewachsen auf Polykarbonatobjektträgern verwendet werden.

4.2.2 Jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms

Bei den Biofilmuntersuchungen der Ehle wurde eine strenge jahreszeitliche Abhängigkeit der Biofilmstruktur und Zusammensetzung festgestellt. Nach einer kurzen Initialbiofilmentwicklung konnte ein für die Jahreszeit typischer benthische Biofilm

beobachtet werden. Die Biofilme wiesen deutliche Unterschiede in ihrer Heterogenität, Struktur sowie Zusammensetzung zwischen den einzelnen Jahreszeiten auf. Außerdem zeichneten sich die Biofilme durch eine hohe morphologische Diversität an Diatomen und Bakterien aus, wobei auf eine genaue Differenzierung verzichtet wurde. Den größten Anteil am benthischen Biofilm besaßen die photoautotrophen Mikroorganismen. Im Frühjahr, Herbst und Winter waren dies hauptsächlich Algen, welche fast ausschließlich der Gruppe der Diatomen zugeordnet werden konnte. Vor allem im Frühjahr zeigte sich eine hohe Diversität an Diatomen, die unter anderem lange Ketten und komplexe Strukturen bildeten. Dadurch zeichneten sich die Frühjahrsbiofilme durch eine besonders heterogene Struktur aus. In zahlreichen früheren Untersuchungen wurde die Diversität der benthischen Algen erforscht (Luttenton et al. 1986, Korte & Blinn 1983, Roemer et al. 1984, Hoagland et al. 1982, Lamb & Lowe 1987). In allen Untersuchungen wurde eine Dominanz der Diatomen während des gesamten Jahres festgestellt sowie eine sehr hohe Diversität, zum Beispiel im unteren Mississippi von 275 Arten (Luttenton et al. 1986).

Im Sommer sank der Anteil an Diatomen hingegen im benthischen Biofilm der Ehle. In diesem Zeitraum bildeten die Cyanobakterien den größten Anteil an den photoautotrophen Mikroorganismen. Die Biofilme zeichneten sich durch eine weitestgehend planare Struktur und eine relativ gleichmäßige Verteilung der Biomasse aus. Im Herbst und Winter wiesen die Biofilme wieder eine komplexe Struktur und eine heterogene Verteilung der Biofilmkomponenten auf.

Die Initialbiofilmentwicklung im Fließgewässer Ehle erfolgte in der ersten Versuchsreihe in sehr kurzer Zeit. Nach einer Expositionsdauer der Aufwuchsträger von nur 2 Tagen in der Ehle hafteten viele Aggregate an der Polykarbonatoberfläche, welche vor allem aus Glykokonjugate und Mineralien bestanden. Auf der Oberfläche dieser Aggregate konnten viele Bakterien beobachtet werden. Vereinzelt wurden auch schon Diatomen gefunden. Nach nur 5 Tagen konnte ein komplexer drei-dimensional Biofilm mit einer Dicke von 76 µm beobachtet werden. Bei anderen Untersuchungen wurde eine viel längere Entwicklungszeit beschrieben (Korte & Blinn 1983). Die Ehle-Biofilme waren während dieser frühen Entwicklungsphase jedoch nicht gleichmäßig entwickelt. Vor allem an der Anströmkante war der Biofilm besonders gut ausgebildet. Diese ungleichmäßige Neubesiedlung von künstlichen aber auch von natürlichen Oberflächen wurde auch von anderen Wissenschaftlern beobachtet (Korte & Blinn 1983, Cattaneo 1978, Munteanu & Maly 1981). Nach 9 Tagen waren die Oberflächen der Polykarbonatprobenträger komplett bedeckt. Lange Diatomenketten und Bakterienfilamente trugen zu einer komplexen Biofilmstruktur sowie zu einer schnellen Zunahme der Biofilmdicke auf 275 µm bei. Ursache für diese schnelle Entwicklung der Ehle-Biofilme könnte die günstige Jahreszeit beim Start der ersten Versuchsreihe gewesen sein. Die Aufwuchsträger wurden hier Anfang April ausgebracht, während die zweite Versuchsreihe erst Mitte September startete. Die Initialbiofilmentwicklung im Herbst verlief wesentlich langsamer. Nach 2 Wochen wies der Biofilm am Standort Ehle 02 nur eine maximale Dicke von 100 µm und am Standort Ehle 04 sogar nur von 63 µm auf. Die Wassertemperatur war zu dieser Zeit zwar noch relativ hoch, jedoch verringert sich die Tageslänge und damit die Sonnenscheindauer. Somit war das Algenwachstum durch eine kürzere Lichtperiode wesentlich geringer als im Frühjahr. Ein weiterer Faktor ist die Anwesenheit von Grazern im September, während im April keine grazenden Organismen auf den Aufwuchsträgern beobachtet wurden.

Nach dieser kurzen Anfangsentwicklung war die Struktur und Zusammensetzung des Ehle-Biofilm streng von der Jahreszeit abhängig. Der entscheidende Faktor war dabei die Entwicklungsdynamik von weidenden Organismen.

Ebenfalls beobachteten Sinsabaugh & Linkins (1988) einen starken saisonalen Einfluss bei ihren Untersuchungen sowohl auf die Biomasse als auch auf die Enzymaktivität. Jahreszeitliche Änderungen der benthischen Biofilmstruktur wurden nur in wenigen Arbeiten beschrieben, da die Untersuchungen oft nur über einen geringen Zeitraum stattfanden. Außerdem wurden bei vielen Untersuchungen Glasobjekträger verwendet, welche in das Fließgewässer gehängt wurden (Roemer et al. 1984, Hoagland et al. 1982). Dadurch hat das Makrozoobenthos keinen direkten Zugang zum untersuchten Biofilm. Der Einfluss von weidenden Organismen und die damit verbundene Änderung der Biofilmstruktur und Zusammensetzung wird dadurch nicht erfasst. Damit wird nur ein potentiell möglicher Biofilm untersucht. Der große Einfluss des Makrozoobenthos auf die Struktur und Zusammensetzung des Biofilms wurde in den vorliegenden Ergebnissen aus der Ehle deutlich. Die Untersuchungen verdeutlichen, dass eine Positionierung der Objektträger auf dem Sediment unbedingt erforderlich ist, um den tatsächlichen benthischen Biofilm zu untersuchen. Eine hohe Anzahl von Makrozoobenthosorganismen fanden auch Sinsabaugh & Linkins (1988) auf und in ihren Biofilmen. Während einige Arten vom Biofilm fraßen, trugen andere durch den Bau von Köchern zu einer Zunahme der benthischen Biomasse bei. Auch filtrierende und räuberisch lebende Makrozoobenthosorganismen liefern zusätzliches Substrat für den benthischen Biofilm.

Im Fließgewässer Ehle überwiegte in den Sommermonaten jedoch das Abweiden des Biofilms durch Makrozoobenthosorganismen. So wurde die erstaunlich schnelle Entwicklung der Biofilme zu einem sehr dicken heterogenen Biofilm im Mai durch das verstärkte Auftreten des Makrozoobenthos auf den Aufwuchsträgern beendet. Durch das Abweiden wies der Biofilm nun nur noch eine geringe Dicke von maximal 50 µm und bestand vor allem aus Bakterien und Cyanobakterien, welche eine dünne Biofilmschicht bildeten. Deutliche Grazingspuren auf den Biofilmen von beiden Standorten wiesen auf die Anwesenheit und den Grazingdruck des Makrozoobenthos während des gesamten Sommers hin. Eine vergleichbare Reduzierung des benthischen Biofilms durch grazende Makrozoobenthosorganismen wurde von Hunter (1980) beschrieben. In Folge einer Individuendichte von 216 Schnecken pro m² verringerte sich die Biotrockenmasse um ca. 80 % innerhalb von 45 Tagen. Außerdem reduzierten sich die Artenanzahl und die Individuenanzahl von Algen im benthischen Biofilm erheblich (Hunter 1980).

Die Biofilmstruktur und Zusammensetzung des benthischen Biofilms in der Ehle änderte sich während der Sommermonate auf Grund des fortwährenden Grazings nur geringfügig. Cyanobakterien hatten den größten Anteil am Biovolumen und traten oft flächendeckend auf. Nur wenige Diatomeen und vereinzelt auch Grünalgen wurden gefunden. Erst im späten Herbst und mit abnehmendem Grazingdruck kam es wieder zu einer Zunahme der Biofilmdicke und zu einer komplexen heterogenen drei-dimensionalen Biofilmstruktur mit einer hohen Diversität von Diatomeen. Dieser komplexe Biofilm blieb über die Wintermonate erhalten und wurde im Frühjahr noch von einer frischen Schicht Diatomeen überlagert. In diesem Zeitraum konnte der Biofilm eine Dicke von bis zu 2,3 mm erreichen. Im Mai kam es dann erneut zu einer dramatischen Abnahme der Biofilmdicke. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten die gleiche Biofilmstruktur und Zusammensetzung wie im Jahr zuvor sowie die gleichen Grazingspuren.

Dies zeigte, dass diese Entwicklung des benthischen Biofilms eindeutig jahreszeitlich bedingt und nicht abhängig vom Alter der Biofilme war oder einmaligen Ereignissen hervorgerufen wurde. Nach einer kurzen Initialbiofilmentwicklung mit einer dafür typischen Struktur wiesen die untersuchten Biofilme eine jahreszeitlich charakteristische Struktur auf, die von der Anwesenheit des Makrozoobenthos bestimmt wird.

Auch Luttenton et al. (1986) fanden eine jahreszeitlich bedingte Änderung der Biofilmstruktur und Zusammensetzung. Während des Frühlings und späten Herbst fanden sie eine sehr komplexe Zusammensetzung. In dieser Zeit waren Diatomeen dominant und

umfassten insgesamt eine Diversität von 275 Arten. Während der Sommermonate konnte hingegen nur eine wenig komplexe planare Struktur beobachtet werden.

Lowe & Gale (1980) untersuchten das Periphyton auf Steinen als Kontrolle zu ihren Experimenten. Die jahreszeitliche Entwicklung zeigt enge Parallelen zu den eigenen Untersuchungen. Die Periphytonbiomasse auf den Steinen war im Januar und Februar sehr hoch. Zum Sommer hin sank sie auf ein Minimum mit einer geringen Algendichte. Im Herbst jedoch stieg die Algendichte auf den natürlichen Substraten sowie auf lang exponierten Objektträgern im Fließgewässer wieder erheblich an und erreichte im Winter ihre höchsten Werte, wobei neu ausgebrachte Objektträger fast keine Neubesiedlung zeigten (Lowe & Gale 1980). Wodurch die starke Abnahme der Diatomen im Sommer ausgelöst wurde, wurde leider nicht diskutiert. Die Beschreibung der Entwicklung weist jedoch große Ähnlichkeiten zu den eigenen Untersuchungen des benthischen Biofilms in der Ehle auf. So lässt sich vermuten, dass die Anwesenheit von Makrozoobenthosorganismen auch hier die Ursache für diese starke Abnahme der Diatomen bei den Untersuchungen von Lowe & Gale (1980) war.

Der Einfluss des Makrozoobenthos auf die Struktur und Diversität der Biofilme wurde nur in sehr wenigen Arbeiten untersucht. Die Makrozoobenthosuntersuchungen in der Ehle zeigten sehr hohe Individuenzahlen von wenigen Arten. Während der Sommermonate wurde eine hohe Anzahl von Köcherfliegenlarven und Bachflohkrebsen sowohl auf dem Sediment als auch auf den Aufwuchsträgern gefunden. Die Grazingspuren auf den Polykarbonatobjektträgern unterschieden sich an beiden Standorten jedoch deutlich voneinander. Am Standort Ehle 02 zeigten sich eher runde fleckige Spuren (**Abb. 3-12D**). Der Biofilm vom Standort Ehle 04 wies dagegen starke Zick-Zack-Spuren auf (**Abb. 3-13D**). Die frischen Spuren waren frei von Cyanobakterien, Bakterien und Algen. Die Grazingspuren am Standort Ehle 04 könnten von der Eintagsfliege *Baetis rhodani* hervorgerufen worden sein. Sie wurde ausschließlich hier nachgewiesen und unter anderem auch direkt auf den Aufwuchsträgern. In der Literatur wird *Baetis rhodani* als ausgesprochener Weidegänger beschrieben (Bazzanti 1991, Bauernfeind et al. 1995), welcher sich vor allem vom benthischen Biofilm ernährt. Als Grazer kommen weiterhin eine Reihe von Köcherfliegenlarven in Betracht. Sie sind zwar in erster Linie Räuber oder Zerkleinerer, einige von ihnen ernähren sich jedoch auch von benthischen Algen (Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft 1996). Durch die hohe gefundene Individuenzahl und das beschränkte Nahrungsangebot ist es sehr wahrscheinlich, dass ein Großteil der Larven vor allem von *Anabolia nervosa* sich vom Biofilm ernährten. Sie wurden sehr oft direkt auf den Aufwuchsträgern beobachtet. Desweiteren ernähren sich Schnecken vom benthischen Biofilm (Nesemann & Reischütz 1995). Diese wurden vor allem am Standort Ehle 02 gefunden und sind wahrscheinlich mitverantwortlich für das dort aufgetretene Grazingmuster.

Dass die in der Ehle gefundenen Grazingspuren durch verschiedene Makrozoobenthosarten an den Standorten verursacht wurden, legen auch die Untersuchungen von Sommer (2000) nahe. Hier wurde versucht, den Einfluss zweier benthischer Herbivoren auf den marinen Biofilm zu erfassen. Beide Arten unterschieden sich weniger in ihrer Selektivität, vielmehr verursachten sie sehr verschiedene Grazing-Muster. Wurde der Biofilm von der Assel *Idothea chelipes* abgefressen, zeigte sich eine homogene Struktur ohne auffällige Grazingspuren. Die Schnecke *Littorina littorea* hingegen bewirkte durch ihr Fraßverhalten eine sehr heterogene Struktur mit deutlichen Grazingspuren sowie eine Zunahme der Algendiversität.

Bei Untersuchungen in Biofilmreaktoren wurden ebenfalls starke Unterschiede im Grazingverhalten zwischen Schnecken, Muschelkrebsen und Eintagsfliegenlarven gefunden (Lawrence et al. 2002). Schnecken und Eintagsfliegenlarven verursachten eine sehr starke Reduzierung aller Biofilmkomponenten sowie der Biofilmdicke. Der Einfluss der Muschelkrebsen war jedoch deutlich geringer vor allem auf die Bakterienbiomasse (Lawrence et al. 2002).

Die Individuenzahl von Makrozoobenthosorganismen und damit der Grazingdruck ist nicht in allen Fließgewässern gleich hoch. Dadurch kann sich die jahreszeitliche Entwicklung der Biofilme sehr unterscheiden. Dies zeigten die starken Unterschiede der Biofilmstruktur zwischen den Ehle-Biofilmen und den Biofilmen aus dem South-Saskatchewan-River. Die untersuchten Standorte der Ehle waren durch Sand und wenigen größeren Steinen geprägt. Eine hohe Anzahl von grazenden Organismen sowie ein geringer Anteil an Hartsubstraten, auf denen sich ein komplexer Biofilm entwickeln kann, führten zu einem extrem hohen Grazingdruck in der Ehle. Dagegen war die Situation im South-Saskatchewan-River völlig anders. Ein hoher Anteil von Hartsubstraten wie Holz und Muscheln sorgte für eine große Besiedlungsfläche für komplexe Biofilme. Auch während der Sommermonate wurden hier nur wenige Makrozoobenthos-Individuen beobachtet. Der Grazingdruck war somit sehr gering. Es konnte sich dadurch ungestört ein Biofilm von mehreren mm Dicke entwickeln, welcher selbst im Juli keine Grazingspuren auswies. Die Biofilme bestanden vor allem aus Algen- und Cyanobakterienfilamenten. Ebenfalls konnte eine große Glykokonjugat-Fraktion detektiert werden.

Diese starken Unterschiede in der Biofilmstruktur und Zusammensetzung zwischen dem benthischen Biofilm der Ehle und des South-Saskatchewan-River wurden in erster Linie vom Makrozoobenthos verursacht. Bei einem verringerten Grazingdruck in der Ehle zum Beispiel im Winter konnte sich auch hier ein ähnlich komplexer Biofilm bis zu einer Dicke von 2,3 mm entwickeln. Aber selbst im Winter wurden vereinzelt Grazingspuren hier gefunden. Für eine Untersuchung des benthischen Biofilms in Fließgewässern ist es somit unbedingt erforderlich die Stärke des Grazingdruckes durch das Makrozoobenthos auf den Biofilm zu erfassen.

Mit der Abnahme des Grazingdruckes im Spätherbst konnte eine stetige Zunahme der Biofilmdicke beobachtet werden. Jedoch zeigten die detektierten Volumen keine stetige Zunahme. Die drei-dimensionale Rekonstruktion der Biofilme zeigte deutlich, dass nur Fluoreszenzsignale der oberste Biofilmschicht von ca. 100 µm detektiert wurden. Die Volumenberechnung der einzelnen Biofilmkomponenten erfolgte somit nur für die oberste Biofilmschicht. An künstlich erzeugten Bruchkanten konnten unter dem Mikroskop für den gleichen Biofilm jedoch eine Biofilmdicke von 1,5 bis 2,3 mm ermittelt werden. Die Biofilme wiesen eine sehr kompakte Struktur auf. Dadurch wurde wahrscheinlich die Eindringtiefe der Mikroskop-Laser herabgesetzt. Im Dezember wurden aus diesem Grund vertikale Querschnitte des Biofilms mit Hilfe eines Kryotoms angefertigt. Aus den Aufnahmen konnte ebenfalls eine Biofilmdicke von 1,5 mm bestimmt werden, während mit der CLSM nur eine Biofilmschicht von ca. 150 µm detektiert werden konnte. Die Querschnitte zeigten, dass fast der gesamte Biofilm aus Algen bestand. Die unterste Schicht wies oft Cyanobakterien auf und an der Biofilmoberfläche waren vor allem Bakterien zu finden. Die Routineuntersuchungen zeigten jedoch eine völlig andere Biofilmzusammensetzung. Da nur die oberste Schicht gescannt wurde, bestand der Biofilm vor allem aus Bakterien und Glykokonjugaten. Es wurden nur wenige Algen detektiert und keine Cyanobakterien. Neben den Querschnitten weisen auch die gemessenen Sauerstoffprofile auf einen hohen Anteil an Algen in dieser Probe hin. Ab einer bestimmten Biofilmdicke sollten somit parallel zu den Routineuntersuchungen Querschnitte des Biofilms angefertigt werden, um die Biofilmzusammensetzung und die Biofilmdicke korrekt zu bestimmen.

Sauerstoffkonzentrationsprofile wurden nur im Zeitraum von Dezember bis April im Labor aufgenommen, da die Biofilmdicke in der restlichen Zeit zu gering für den Einsatz von Mikroelektroden war. Bei optimalen Lichtbedingungen wiesen die Biofilme von beiden Probenahmestandorten eine sehr hohe Sauerstoffproduktion auf. Von Dezember bis Februar war die Biofilmdicke am Standort Ehle 04 zwar wesentlich geringer, jedoch durch ein

vergleichbares Volumen an Algen wurden deutlich höhere Sauerstoffkonzentrationen sowie Massestromdichten (als Maß für die flächenbezogene Netto-Photosynthese) hier erreicht. Für den Standort Ehle 02 wurden in diesem Zeitraum flächenbezogene Netto-Photosyntheseraten von 10,4 bis 13,8 g O₂/m²d berechnet und für den Standort Ehle 04 von 21,1 bis 37,5 g O₂/m²d. Für die Berechnungen wurde jedoch ein Diffusionskoeffizient von 0,00021 m²/d angenommen. Durch die sehr dicken kompakten Biofilme ist der tatsächliche Diffusionskoeffizient im Biofilm vermutlich wesentlich geringer. Dadurch würden sich die berechneten Massestromdichten verringern. In Diatomebiofilmen wurde von Glud et al. (1992) ein Diffusionskoeffizient für Sauerstoff von 0,000124 m²/d bestimmt. Glud et al. (1995) ermittelten in mikrobiellen Matten einen Diffusionskoeffizienten von nur 0,0000976 m²/d. Für hypersaline Matten bestimmten Eppingen & Jørgensen (1996) einen Diffusionskoeffizienten von ca. 0,000165 m²/d. Diese Diffusionskoeffizienten würden die berechneten flächenbezogenen Netto-Photosyntheseraten um ca. 22 bis 53 % verringern.

Im März und April stieg das Volumen an Algen erheblich an und damit ebenfalls die erreichten Sauerstoffkonzentrationen. Die Profile der Sauerstoffkonzentration im Biofilm unterschieden sich an beiden Standorten deutlich voneinander. Die Biofilmquerschnitte vom Standort Ehle 02 zeigten, dass sich die Algen vor allem an der Biofilmoberfläche konzentrierten. Dementsprechend zeigten die Sauerstoffkonzentrationsprofile einen sehr starken Anstieg an der Biofilmoberfläche und danach eine stetige Abnahme der Sauerstoffkonzentration. Hier wurden flächenbezogene Netto-Photosyntheseraten bis zu 27,3 g O₂/m²d gemessen. Am Standort Ehle 04 wiesen die Querschnitte eine gleichmäßige Verteilung sowie ein sehr hohes Volumen von Algen auf. Die Sauerstoffkonzentration stieg bis in tiefere Biofilmschichten auf max. 60 mg/l bei einer flächenbezogenen Netto-Photosyntheserate von ca. 29,8 g O₂/m²d (berechnet mit einem Diffusionskoeffizienten von 0,00021 m²/d). Vergleichbare Sauerstoffkonzentrationen von ca. 58 mg/l wurden ebenfalls in Cyanobakterien-Biofilmen in einer Biofilmtiefe von ca. 400 µm und mit einer flächenbezogenen Netto-Photosynthese von ca. 7,8 g O₂/m²d gefunden (Kühl et al. 1996). Für die Berechnung der Photosyntheseraten ermittelten sie den effektiven Sauerstoffdiffusionskoeffizienten im Biofilm. Auch in hypersalinen Matten kann die Sauerstoffkonzentration auf maximale Werte von ca. 60 mg/l in einer Sedimenttiefe von ca. 1,5 mm ansteigen (Eppingen & Jørgensen, 1996).

Bei allen in den Ehle-Biofilmen ermittelten Sauerstoffkonzentrationen und Photosyntheseraten muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese bei optimalen Lichtbedingungen und einer Wassertemperatur von 13,5 °C im Labor bestimmt wurden. Im Fließgewässer werden durch sehr niedrige Wassertemperaturen im Winter sowie schlechte Lichtbedingungen in Folge von tiefem Sonnenstand, Beschattung und Wassertrübung nicht annähernd so hohe Photosyntheseraten und Sauerstoffkonzentrationen am Tage erreicht. Durch die hohen gemessenen Biofilmdicken und die hohe Biomassen ist es sehr wahrscheinlich, dass in der Nacht auch anoxische Verhältnisse in den unteren Biofilmschichten auftreten können.

4.2.3 Einfluss der Hydrodynamik und der Nährstoffbedingungen auf die Struktur und Entwicklung des benthischen Biofilms

Die Untersuchungen zum Einfluss der Hydrodynamik auf die Biofilmentwicklung und die Biofilmstruktur in Biofilmreaktoren zeigten nur einen geringen Einfluss auf die detektierten Biovolumen jedoch einen großen Einfluss auf die Biofilmstruktur.

Über 18 Wochen wurde die Biofilmentwicklung in zwei Reaktoren bei unterschiedlicher hydrodynamischer Beanspruchung beobachtet. Die Besiedlung in den Reaktoren verlief wesentlich langsamer als im Fließgewässer. Erst nach 4 Wochen konnten nennenswerte

Volumen und eine Biofilmdicke von ca. 120 μm ermittelt werden. In den nächsten Wochen wurden im Reaktor mit der geringeren Rotationsgeschwindigkeit höhere Volumen an Glykokonjugaten festgestellt. Am Ende des Experiments unterschieden sich die Biofilme aus beiden Reaktoren jedoch nur gering in der maximalen Biofilmdicke sowie in den ermittelten Volumen der einzelnen Biofilmkomponenten. Diese Ergebnisse lassen sich gut aus den Untersuchungen von Reiter & Carlson (1986) erklären, die den Einfluss der Fließgeschwindigkeit im Labor in Fließrinnen untersuchten. Am Beginn ihrer Experimente zeigten sich deutliche Unterschiede in der Diversität und den Biomassen zwischen den einzelnen Fließgeschwindigkeiten. Dies änderte sich jedoch mit der Zeit und alle untersuchten Parameter glichen sich an. Am Ende des Experiments konnten fast keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Fließgeschwindigkeiten festgestellt werden. Sie stellten fest, dass sich die Fließgeschwindigkeit direkt über dem Biofilm im Verlauf des Experimentes angeglichen hat. Am Anfang unterschied sich die Fließgeschwindigkeit an der Biofilmoberfläche stark voneinander und so war ein starker Einfluss auf die Entwicklung gegeben. Das Wachstum der Algen bewirkte eine Veränderung der Strömungsbedingungen an der Oberfläche und ein Absinken der Fließgeschwindigkeit direkt an der Biofilmoberfläche. Somit war die Fließgeschwindigkeit an der Oberfläche des Biofilms unabhängig von der tatsächlichen im Wasser vorhandenen Fließgeschwindigkeit. Dies hatte zur Folge, dass sich in allen Fließrinnen trotz unterschiedlicher Fließgeschwindigkeit ein sehr ähnlicher Biofilm mit vergleichbaren Biomassen und gleichen Algenarten herausbildete (Reiter & Carlson 1986). Bei heterotrophen Reaktorbiofilmen wird hingegen ein starker Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Biofilmdicken sowie die Biofilmeigenschaften beschrieben (Wäsche et al. 2002).

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass die hydrodynamischen Bedingungen einen großen Einfluss auf die Struktur der Biofilme besitzen. Biofilme gewachsen bei einer geringen hydrodynamischen Beanspruchung wiesen eine gleichmäßige Verteilung ohne auffällige strukturelle Merkmale auf. Bei einer hohen hydrodynamischen Beanspruchung wuchsen die Biofilme stark parallel orientiert zur Strömungsrichtung. Es bildeten sich sogenannte "ridges", Biomasseansammlungen in schmalen Längsstreifen parallel zur Fließrichtung. Bakterienfilamente im Biofilm waren ebenfalls ausgerichtet nach der Fließrichtung. Solche Strukturen wurden auch von anderen Wissenschaftlern in Biofilmreaktoren beobachtet (Gjaltema et al. 1994, Stoodley et al. 1999). Auch im zweiten Experiment wo beide Reaktoren mit einer hohen Rotationsgeschwindigkeit liefen, wies der Biofilm die typische ausgerichtete Struktur auf. Vergleichbare Strukturen wurden bei natürlichen benthischen Biofilmen noch nie beschrieben, sondern ausschließlich bei Reaktorbiofilmen. Reiter & Carlson (1986) stellten ebenfalls visuell starke Unterschiede zwischen den Biofilmen gewachsen unter verschiedenen Fließgeschwindigkeiten fest. Sie konnten sich diese Unterschiede jedoch nicht erklären, da in allen Fließzellen die gleichen Algenarten und Biomassen gefunden wurden. Somit besitzen die hydrodynamischen Bedingungen einen großen Einfluss auf die Struktur von photoautotrophen Biofilmen, anscheinend aber einen geringen auf die Biomassen und Algendiversität, da das Wachstum der Algen die lokale Fließgeschwindigkeit an der Biofilmoberfläche angleicht.

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der Strömungsbedingungen auf den natürlichen benthischen Biofilm aus dem South-Saskatchewan-River in Kanada wurden jedoch große Unterschiede zwischen den Biofilmen aus der Flussmitte und den Biofilmen vom Flussrand gefunden. Dahingegen zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede auf den verschiedenen Substratoberflächen. Die quantitativen Ergebnisse zeigten ein wesentlich höheres Volumen in den Biofilmproben aus der Flussmitte gegenüber den Biofilmproben vom Flussrand. Dabei bildeten vor allem Algen den mit Abstand größten Anteil des Volumens. Unterschiede

zwischen den Proben zeigten sich ebenfalls in den Sauerstoffprofilen, den Netto- und den Brutto-Photosyntheseraten. Die Sauerstoffkonzentrationen bei Photosynthese lagen bei den Biofilmen aus der Flussmitte deutlich höher (max. 17 bis 20 mg/l) als bei Biofilmen vom Flussrand (max. 9 bis 13 mg/l). Im Allgemeinen wiesen die Biofilme aus dem South-Saskatchewan-River (Kanada) erheblich geringere Sauerstoffkonzentrationen (max. 20 mg/l) und flächenbezogene Netto-Photosyntheseraten (max. 3,22 g O₂/m²d) gegenüber den Biofilmen aus der Ehle auf. Die Kanada-Biofilme wiesen zwar eine hohe Dicke auf, jedoch zeigen die CLSM-Aufnahmen, dass die Biofilme eine sehr lockere Struktur aus Algen- und Cyanobakterienfilamenten besaßen. Dahingegen wiesen die Ehle-Biofilme eine sehr kompakte Struktur aus Diatomen auf mit deutlich höheren Volumen an Algen (bestimmt aus den vertikalen Querschnitten).

Mit Hilfe der „light-dark-shift“ Methode wurden bei den Kanada-Biofilmen die volumenbezogene Brutto-Photosyntheseraten in jeder Biofilmschicht bestimmt. Die volumenbezogene Brutto-Photosynthese wies bei den Biofilmen gewachsen auf Holz in der Flussmitte maximale Werte von ca. 0,35 g O₂/m³s in einer Biofilmtiefe von ca. 500 µm auf. Biofilme gewachsen auf Muschelschalen in der Flussmitte erreichten eine volumenbezogene Brutto-Photosyntheserate von ca. 0,2 g O₂/m³s in einer Biofilmtiefe von ca. 300 bis 500 µm. Trotz dieser deutlich geringeren volumenbezogenen Brutto-Photosyntheserate in Folge einer geringeren Algenbiomasse wiesen diese Biofilme höhere Sauerstoffkonzentrationen sowie höhere flächenbezogene Netto-Photosyntheseraten gegenüber den Proben auf Holz an diesem Standort auf. Dies kann nur durch eine höhere Respiration in Folge einer größeren respiratorischen Biomasse in den Biofilmen gewachsen auf Holz erklärt werden. Ursache dafür könnte eine bessere Versorgung der heterotrophen Mikroorganismen durch organische Substanzen aus dem Holz sein. Eine höhere Aktivität von Holzabbauenden Enzymen in Biofilmen gewachsen auf Holz wurde von Sinsabough et al. (1991) nachgewiesen.

Die Biofilme vom Flussrand wiesen geringere volumenbezogene Brutto-Photosynthese von max. 0,15 g O₂/m³s auf. Durchschnittlich lagen sie jedoch hier deutlich unter 0,1 g O₂/m³s.

Bei Cyanobakterienbiofilmen konnte in ca. 400 µm Tiefe eine volumenbezogene Brutto-Photosyntheserate von ca. 0,8 g O₂/m³s ermittelt werden (Kühl et al. 1996), jedoch wurde hier eine Sauerstoffkonzentration von ca. 58 mg/l erreicht. Ebenfalls in Cyanobakterienbiofilmen wurde eine mit den Kanada-Biofilmen vergleichbare volumenbezogene Brutto-Photosyntheserate von 0,16 g O₂/m³s bei einer Sauerstoffkonzentration von ca. 18,4 mg/l in einer Tiefe von 600 µm gefunden (Pringault & Garcia-Pichel, 2000).

Die Unterschiede in den volumenbezogenen Brutto-Photosyntheseraten der Kanada-Biofilme erklären sich aus den unterschiedlichen Volumen der photoautotrophen Mikroorganismen ermittelt aus den CLSM-Bilder. Die Biofilme aus der Flussmitte wiesen höhere Algenvolumen und dadurch höhere Brutto- und Netto-Photosyntheseraten sowie höhere Sauerstoffkonzentrationen gegenüber den Biofilmen vom Flussrand auf.

Bereits Anfang der achtziger Jahre wurden Untersuchungen zum Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Entwicklung und Zusammensetzung von Biofilmen durchgeführt. Jedoch sind auch hier die Ergebnisse verschiedener Wissenschaftler widersprüchlich, sowohl bei den Untersuchungen zur Gesamtanzahl als auch zur Diversität von Diatomen. Viele stellten eine höhere Anzahl und einer größere Diversität von Diatomen in schwach strömenden Bereichen fest (Lamb & Lowe 1981, Luttenton et al. 1986, Lamb & Lowe 1987). Andere beobachteten eine Erhöhung der Periphyton-Zuwachsrates mit zunehmender Strömung (Horner & Welch 1981) sowie eine größere Anzahl und Diversität von Diatomen in stark strömenden Bereichen (Korte & Blinn 1983). Vielleicht können diese unterschiedlichen Ergebnisse ebenfalls auf die verschiedene Arten und Weise der Probengewinnung zurückgeführt werden.

Sinsabough & Linkins (1988) schlussfolgerten, dass eine hohe Strömung die Besiedlung beschleunigt aber die Biomasseakkumulation limitiert. Durch den schnellen Stofftransport ist

die mikrobielle Aktivität im Biofilm höher als bei einer geringen Fließgeschwindigkeit. Hier ermöglichen aber geringe Scherkräfte eine höhere Akkumulation von Biomasse. Jedoch kann es durch einen geringen Nährstofftransport in den Biofilm und lange Diffusionswege zu Limitationen kommen.

Wahrscheinlich spielt noch ein anderer Aspekt bei den kanadischen Untersuchungen eine entscheidende Rolle. Es besteht die Möglichkeit, dass das Algenwachstum durch geringere Nährstoffkonzentrationen am Rand des Flusses limitiert wurde und aus diesem Grund nur geringere Biovolumen an Algen hier erzielt werden konnten. Am Rand des Flusses war durch den niedrigen Wasserstand nur noch eine sehr geringe Strömung vorhanden. Durch den hohen Anteil an Hartsubstraten und damit einen hohen Anteil an komplexen Biofilmen waren die vorhandenen Nährstoffe hier wahrscheinlich schnell verbraucht. Das Biofilmwachstum war dadurch limitiert. Die geringere Konzentration an photoautotrophen Mikroorganismen verursachte auch die geringere Sauerstoffkonzentration sowie Sauerstoffproduktion in diesen Biofilmen. Da eine geringere Nährstoffkonzentration das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen vermindert, zeigten auch die Untersuchungen in den Rotating Annular Reaktoren. Hier wurde der Einfluss von Ammonium im zweiten Reaktorversuch untersucht. Höhere Ammoniumkonzentrationen im Reaktorwasser bewirkten eine Zunahme des Bakterienvolumen, der Glykokonjugate und vor allem des Algenvolumen. Dies wirkte sich auch deutlich in den Sauerstoffprofilen aus. Die Biofilme gewachsen bei zusätzlicher Ammoniumzugabe wiesen deutlich höhere Sauerstoffkonzentrationen vom max. 18 mg/l auf. Obwohl die Reaktoren ebenfalls mit Ehle-Wasser betrieben wurden, wiesen die Biofilme deutlich geringere Sauerstoffkonzentrationen sowie flächenbezogene Netto-Photosyntheseraten gegenüber den Ehle-Biofilmen auf. Bei Zugabe von Ammonium konnte eine max. flächenbezogene Netto-Photosyntheserate von 4,37 gO₂/m²d ermittelt werden. Beim Betrieb der Reaktoren mit reinem Ehle-Wasser konnte nur eine flächenbezogene Netto-Photosyntheserate von 2,82 gO₂/m²d bestimmt werden. Die quantitativen Ergebnisse der Bildanalyse zeigten, dass die Reaktorbiofilme deutlich geringere Volumen an photoautotrophen Mikroorganismen auswiesen. Das Wachstum der Algen und Cyanobakterien war zusätzlich durch die geringen Lichtintensitäten in den Reaktoren limitiert.

Im Allgemeinen war die Entwicklung des Biofilms aus den Rotating-Annular-Reaktoren völlig unterschiedlich zu der im natürlichen Gewässer. Durch die schlechten Lichtbedingungen in den Reaktoren war das Wachstum der Algen sowie der Cyanobakterien deutlich eingeschränkt. Biofilmreaktoren werden sehr häufig genutzt, um die Transport- und Diffusionsvorgänge sowie Umsatzraten in den Biofilmen zu untersuchen und beschreiben zu können. Diese Untersuchungen sind wichtig für den Einsatz von Biofilmen in der Abwasserbehandlung. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf natürliche Biofilme ist jedoch kritisch. Ein hoher Anteil von photoautotrophen Mikroorganismen in natürlichen benthischen Biofilmen könnte die Eigenschaften von Biofilmen erheblich verändern. Die Möglichkeit einer starken Verminderung der Fließgeschwindigkeit an der Biofilmoberfläche durch das Algenwachstum ist ein Beispiel dafür. In heterotrophen und chemoautotrophen Biofilmen wurden verschiedene Einflüsse der Fließgeschwindigkeit auf eine Reihe von Prozessen gefunden (Beyenal & Lewandowski 2000). Ob dies auch auf photoautotrophe Biofilme in Fließgewässern zutrifft, muss noch untersucht werden. Für solche Untersuchungen wären Rotating-Annular-Reaktoren wenig geeignet, da die Lichtbedingungen hier sehr ungünstig sind. Für weiterführende Untersuchungen zum Einfluss von Umweltbedingungen oder zu Diffusion- und Transportvorgängen im benthischen Biofilm sollten Fließbrinnen eingesetzt werden, die eine bessere Lichtversorgung gewährleisten und die natürlichen Bedingungen im Fließgewässer besser widerspiegeln.

4.3 Modellierung mit AQUASIM

4.3.1 Simulation der jahreszeitlichen Entwicklung von Fließgewässerbiofilmen

Mit den gewonnenen Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen konnte erfolgreich die jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms in einem Fließgewässer simuliert werden. Obwohl es eine Vielzahl von Modellen gibt, welche Transport- und Stoffumwandlungsprozesse in Reaktorbiofilmen simulieren (Hao et al. 2002, Horn & Hempel 1998, Picioreanu et al. 2000b, Eberl et al. 2000, Hermanowicz 1999, Noguera et al. 1999b, Arcangeli & Arvin 1999), konnte in der Literatur keine Simulation zur Entwicklung des benthischen Biofilms von Fließgewässern im Verlauf des Jahres gefunden werden.

Für die Simulation wurde das Programm AQUASIM (Reichert 1994) verwendet. Die Biofilmprozesse wurden in Anlehnung an das IWA River Water Quality Model No.1 formuliert. Dieses Modell beinhaltet eine Vielzahl von biochemischen Prozessgleichungen und liefert eine umfangreiche Beschreibung der Prozesse in Fließgewässern (Shanahan et al. 2001, Reichert et al. 2001, Vanrolleghem et al. 2001). In der von Reichert (2001) durchgeführten Simulation der Sauerstoff- und Stickstoff-Umwandlungsprozesse wird von einer konstanten benthischen Biomasse ausgegangen. Die Integration einer sich dynamisch verändernden benthischen Biomasse wurde nur theoretisch beschrieben, da keine experimentellen Daten zur Entwicklung des benthischen Biofilms vorlagen. Mit den experimentellen Untersuchungen an der Ehle konnte die starke Veränderung des Biofilmvolumens sowie der Biofilmdicke während des Jahres mit AQUASIM simuliert werden. Dennoch muss beachtet werden, dass solche Simulationen nur auf einem vereinfachten Modell des Biofilms basieren. Die Heterogenität des Biofilms, z. B. die ungleichmäßige Verteilung der Biofilmkomponenten und die heterogene Biofilmoberfläche, wird in Biofilmmodellen vernachlässigt. Ferner können im Biofilm Dichteschwankungen auftreten, die zu lokalen Veränderungen der Lebensbedingungen der Mikroorganismen, z.B. durch eine Änderung der Diffusionsbedingungen von Nährstoffen, führen können. In dicken Biofilmen werden oft Kanäle gefunden, die eine Versorgung der Mikroorganismen tiefer liegender Biofilmschichten mit Nährstoffen gewährleisten. Weiterhin ist es sehr schwierig Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen im Biofilm in Modellen zu integrieren. Bis jetzt ist es noch nicht möglich solche speziellen Besonderheiten in einem Biofilmmodell zu berücksichtigen. Für die Simulation der jahreszeitlichen Entwicklung eines natürlichen Biofilms ist jedoch ein vereinfachtes Biofilmmodell ausreichend.

Der Biofilm in der durchgeführten Simulation bestand aus heterotrophen Bakterien, photoautotrophe Mikroorganismen (Algen und Cyanobakterien) sowie Glykokonjugate als inertes Material. Das Wachstum der Bakterien wurde in Anlehnung an Reichert et al. (2001) formuliert, jedoch ohne Abhängigkeit von der Ammonium-, Nitrat- und Phosphatkonzentration. Für das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen wurde nur die Funktion der Temperaturabhängigkeit von Reichert et al. 2001a in die Prozessgleichung integriert. In der Simulation wird davon ausgegangen, dass das Wachstum sowohl von den Bakterien als auch von den Algen nicht Stickstoff- oder Phosphat-limitiert ist. Da nur unzureichende Werte zu den Lichtbedingungen an der Oberfläche des benthischen Biofilms existieren, wurde zur Beschreibung des Einflusses des Lichtes auf das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen ein Lichtfaktor eingeführt. Die von Reichert et al. (2001) empfohlenen Steele-Funktion erfordert eine Lichtintensitätsbestimmung während des gesamten Tages sowie des gesamten Jahres um die Änderung der Lichtbedingungen bei einer Veränderung der Tag/Nachtlängen während des Jahres zu erfassen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Lichtfaktor basierend auf der vom Deutschen Wetterdienst

bestimmten Sonnenscheindauer formuliert. Durch diese Vereinfachung kann jedoch nicht die Dynamik der Sauerstoffkonzentration während des Tag/Nachtzyklus betrachtet werden. Die Sonnenscheindauer gibt jedoch gut die Änderung der Lichtbedingungen während des Jahres wieder. Auch ist in ihm die Tag- und Nachtphase enthalten. Ein Lichtfaktor von 0,25 bedeutet dass an 6 Stunden des Tages das Wachstum der photoautotrophen Mikroorganismen nicht vom Licht limitiert ist. Zusätzlich müsste jedoch noch die Trübung des Flusswassers erfasst werden, da sie eine Verringerung des Lichtfaktors bewirken würde. Außerdem müsste ebenfalls eine Abnahme der Lichtintensität im Biofilm selbst mit zunehmender Tiefe eingebaut werden, da sowohl eine Veränderung der Lichtqualität als auch eine Abnahme der Lichtintensität im Biofilm nachgewiesen wurde (Kühl & Jørgensen 1994, Kühl et al. 1996).

Neben dem Wachstum der Bakterien und photoautotrophen Mikroorganismen wurde auch eine Produktion von extrazellulären Substanzen (inertes Material) integriert. Die aktive Produktion von extrazellulären Substanzen durch Bakterien wie auch durch Algen wurde in viele Arbeiten beschrieben (Kaplan & Bott 1982, Sutherland 2001a, b) jedoch nur in Modellen von Reaktorbiofilmen (Horn et al. 2001, Kreft & Wimpenny 2001) berücksichtigt. Smith & Underwood (1998) bestimmten eine Produktion von extrazellulären Substanzen von 1 bis 10 % der Photosyntheseassimilate von Diatomen und Bakterien in natürlichen Sedimenten. Horn et al. (2001) integrierten die Produktion von extrazellulären Substanzen in ihr Modell eines heterotrophen Biofilms. Auch Kuehn et al. (2001) und Kreft & Wimpenny (2001) konnten durch die Integration der Produktion von extrazellulären Substanzen in ihre Modelle ihre Bedeutung für die Biofilmentwicklung zeigen. In der Simulation der Biofilmentwicklung in der Ehle wurde die Produktion von extrazellulären Substanzen von 10 % des Wachstums der photoautotrophen wie auch der heterotrophen Mikroorganismen angenommen.

In der Simulation wurden verschiedene Biomasseabtragsfunktionen für die verschiedenen Jahreszeiten integriert. Im Winter und im zeitigen Frühjahr, wenn noch keine oder nur sehr wenige grazende Organismen im Fließgewässer vorhanden sind, wurde der Biomasseabtrag an die Biofilmdicke gekoppelt. Mit zunehmender Biofilmdicke nimmt auch der Abtrag von Biomasse zu. Die Zunahme der Biofilmdicke wurde jedoch auf eine maximal mögliche Biofilmdicke begrenzt.

Der Biomasseabtrag durch das Abweiden des Biofilms durch die Makrozoobenthosorganismen während des übrigen Zeitraums wurde über eine zusätzliche Biomasseabtragsfunktion formuliert. Dadurch konnte darauf verzichtet werden, das Makrozoobenthos als eigene Organismengruppe in die Simulation zu integrieren, da nicht genügend Informationen zur jahreszeitlichen Entwicklung dieser Organismen vorlagen. In der Literatur wurde nur bei Reichert (2001) eine Berücksichtigung der grazenden Organismen in einem theoretischen Biofilmmodell gefunden. Sie wurden hier als eigene Organismengruppe ins Modell integriert. Ihr Wachstum war von der Temperatur, der Sauerstoffkonzentration und der benthischen Biomasse abhängig. Aus den eigenen Untersuchungen lässt sich vermuten, dass noch andere Faktoren einen erheblichen Einfluss auf das Vorkommen und Wachstum des Makrozoobenthos besitzen. Ansonsten lässt sich nicht erklären, warum in einigen Flüssen ein massives Auftreten und Abweiden des Biofilms beobachtet werden kann, während in anderen Fließgewässern nur wenige Makrozoobenthosorganismen gefunden werden. Somit muss der Grazingdruck im zu modellierenden Fließgewässer untersucht und im Modell angepasst werden. Im Fließgewässer Ehle wurde eine hohe Anzahl von Makrozoobenthosorganismen gefunden. Der Biofilm war während des gesamten Sommers bis auf wenige μm abgeweidet und zeigte deutliche Grazingspuren. Im Zeitraum von Anfang Mai bis Ende Oktober wurde eine verstärkte Aktivität des Makrozoobenthos beobachtet. Der Biomasseabtrag durch das Makrozoobenthos wurde in Abhängigkeit von der Temperatur und der Biofilmdicke

formuliert. Bei einer sehr geringen Biomasse ist somit selbst im Sommer nur ein geringer Biomasseabtrag möglich, jedoch ist er so groß, dass während des gesamten Sommers der Biofilm nur eine sehr geringe Dicke aufweist. Im September mit abnehmender Temperatur geht die Grazingaktivität zurück und die Biofilmdicke nimmt leicht zu. Durch einen zusätzlichen Intensitätsfaktor I_G kann die Stärke des Grazingdrucks angepasst werden. Somit kann die Biofilmentwicklung auch in anderen Fließgewässern mit einem geringen Aufkommen von Makrozoobenthosorganismen simuliert werden. Der Intensitätsfaktor kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Bei einem Intensitätsfaktor von 0 ist kein Grazing vorhanden, der Grazingfaktor besitzt dann den Wert 1 und der Biofilmabtrag ist somit nur von der Biofilmdicke abhängig. Es findet in der Anfangsentwicklung ein exponentielles Biofilmwachstum statt bis zu einer festgelegten maximalen Biofilmdicke. Mit einem Intensitätsfaktor von 0,5 wird ein mittlerer Grazingdruck durch das Makrozoobenthos simuliert und bei einem Faktor von 1 ist ein sehr starker Grazingdruck vorhanden. So kann die Abtragsfunktion an die jeweiligen Bedingungen im Fließgewässer angepasst werden. In der Simulation der Biofilmentwicklung in der Ehle wurde ein Intensitätsfaktor von 1 verwendet. Die meisten für die Simulation verwendeten Parameter, wie zum Beispiel die spezifischen Wachstumsraten und die Respirationskoeffizienten, wurden von Reichert et al. (2001) übernommen. Durch die Änderungen in Bezug auf die Formulierungen zum Einfluss der Lichtbedingungen sowie der Biomasseabtragsfunktion durch die Makrozoobenthosorganismen konnte die oben beschriebene Entwicklung der benthischen Biofilmgemeinschaft im Fließgewässer Ehle sehr gut mit dem IWA River Water Quality Model No.1 simuliert werden. Außerdem bietet der Intensitätsfaktor für das Makrozoobenthos die Möglichkeit, die Biofilmentwicklung auch in anderen Fließgewässern mit geringem oder keinem Grazingdruck simulieren zu können.

4.3.2 Simulation der Sauerstoffkonzentrationsprofile und der photosynthetischen Aktivität im benthischen Biofilm

Ein Fließgewässer mit einem sehr geringen Grazingdruck ist zum Beispiel der South-Saskatchewan-River. Hier wurden im Sommer Biofilme von einigen mm Dicke beobachtet. In den hier vorkommenden benthischen Biofilmen sollten Sauerstoffkonzentrationsprofile sowie die Sauerstoffproduktion durch die photosynthetische Aktivität der photoautotrophen Mikroorganismen in den einzelnen Biofilmschichten simuliert werden. Wie schon oben beschrieben wurden Biofilmproben von verschiedenen Substraten und Standorte mit unterschiedlicher Fließgeschwindigkeit untersucht. Für die Simulation wurden die Biovolumen der einzelnen Biofilmkomponenten mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie für jede Biofilmschicht ermittelt und ins Modell als Basisinformation eingegeben. Durch die höheren detektierten Biovolumen bei den Proben aus der Flussmitte, besaßen diese eine höhere mittlere Dichte, d.h. einen höheren Anteil von festen zu flüssigen Biofilmbestandteilen, als die Biofilmproben vom Flussrand. Damit konnten die gemessenen Sauerstoffkonzentrationsprofile in allen untersuchten Biofilmproben sehr gut abgebildet werden.

Als Biofilmprozesse wurden die photosynthetische Sauerstoffproduktion sowie die Respiration der Algen und Cyanobakterien in Anlehnung an das IWA River Water Quality Model No.1 formuliert. Zur Simulierung der gemessenen Sauerstoffprofile wurden die Stoffübergangskoeffizienten aus den Sauerstoffprofilen berechnet und im Modell zur Beschreibung des Stoffüberganges an der Biofilmoberfläche verwendet. Für die untersuchten Biofilmproben lagen die Stoffübergangskoeffizienten zwischen $0,94$ und $1,33 \cdot 10^{-5}$ m/s und mußte nur geringfügig im Modell angepasst werden. Durch eine Anpassung der Respirationskoeffizienten konnten die gemessenen Sauerstoffprofile sehr gut mit Hilfe dieses einfachen Biofilmmodells simuliert werden. Die Sauerstoffrespiration besaß einen Anteil von

ca. 38 bis 67 % der Sauerstoffproduktion in der Simulation. Vergleichbare Prozentanteile wurden von Glud et al. (1992), Kühl et al. (1996) und Epping & Jørgensen (1996) ermittelt. Dahingegen wird im IWA River Water Quality Model No. 1 nur eine Respiration der Algen von ca. 2,3 % von der Photosynthese angenommen (Reichert et al. 2001). In dem Biofilmmodell von Rauch & Vanrolleghem (1998) besaß die Respiration hingegen einen Anteil von 50 % an der maximalen Photosynthese.

Messungen der photosynthetischen Sauerstoffproduktion mit Hilfe der „light-dark-shift“-Methode erbrachten bei den Biofilmprouben aus der Hauptströmung vergleichbare Ergebnisse in den einzelnen Biofilmschichten wie die Simulation. Bei den Biofilmprouben vom Flussrand wurde die photosynthetische Sauerstoffproduktion in der Simulation etwas unterschätzt. Damit ist auch die Respiration bei diesen Prouben unterschätzt worden. Im Modell wurden nur die photoautotrophen Mikroorganismen berücksichtigt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass jedoch eine nicht unerhebliche Biomasse an heterotrophen Mikroorganismen im Biofilm besonders bei denen gewachsen auf Holz enthalten sind. Die ermittelten Algenbiomassen und volumenbezogenen Brutto-Photosyntheseraten sind bei den Biofilmen gewachsen auf Holz höher als bei den Biofilmen gewachsen auf Muschelschalen (jeweils betrachtet vom gleichen Standort). Die gemessenen Sauerstoffkonzentrationen und die flächenbezogenen Netto-Photosyntheseraten sind jedoch bei den Biofilmen gewachsen auf Muschelschalen höher. Dies kann nur durch eine höhere Respiration bzw. ein höhere Biomasse an heterotrophen Mikroorganismen in den Biofilmen auf Holz erklärt werden. Der Anteil an Bakterien in den Biofilmprouben ist jedoch zu gering, um diese Unterschiede zu erklären. Beim Abbau von Blättern und Holz in Fließgewässern sind neben Bakterien auch aquatische Pilze beteiligt (Bärlocher 1992, Shearer 1992, Gessner et al. 1997). Sinsabaugh et al. (1991) konnten in Biofilmen gewachsen auf Holz eine höhere Biomasse an Pilzen sowie eine höhere Aktivität Holzabbauender Enzyme gegenüber Biofilmen auf Glas nachgewiesen werden. Durch einen höheren Anteil an Pilzen und damit eine höhere Respiration in den Biofilmen gewachsen auf Holz ließen sich die ermittelten Unterschiede erklären.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur und Entwicklung des benthischen Biofilm von Fließgewässern im Verlauf eines Jahres beschrieben. Mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Biofilms sowie seine Struktur innerhalb des Jahres stark variieren und eine strenge jahreszeitliche Abhängigkeit aufweisen. Im Frühjahr zeichnen sich die Biofilme durch eine hohe Heterogenität, eine komplexe Struktur und eine hohe Diversität von Bakterien und Diatomen aus. Während der Sommermonate wiesen hingegen die Biofilme nur eine planare Struktur von wenigen μm Dicke und eine sehr geringe Diversität von Diatomen auf. Den größten Anteil am Biovolumen besitzen in diesem Zeitabschnitt die Cyanobakterien, während sie zu den anderen Jahreszeiten nur ein sehr geringes Biovolumen aufweisen. Diese Veränderung des benthischen Biofilms wurde durch die Populationsdynamik von weidenden Makrozoobenthosarten hervorgerufen, die während der Sommermonate den Biofilm bis auf wenige Bakterien und Cyanobakterien ständig abweiden. Die Biofilme weisen in diesem Zeitraum ein charakteristisches Grazingmuster auf. Im Herbst und Winter mit abnehmendem Grazingdruck nehmen die Biofilmdicke, die Biovolumen von Algen, Bakterien und Glykokonjugaten sowie die Komplexität des Biofilms wieder stetig zu.

Diese jahreszeitliche Änderung der Dicke und Zusammensetzung des benthischen Biofilms im Fließgewässer Ehle konnte erfolgreich mit dem Programm AQUASIM simuliert werden. Die für die Simulation verwendeten Prozessgleichungen wurden in Anlehnung an des IWA River Water Quality Model No. 1 formuliert. Der Biomasseabtrag durch die grazenden Makrozoobenthosorganismen konnte durch eine zusätzliche Abtragsfunktion verwirklicht werden. Die simulierte Biofilmentwicklung zeigte sehr gute Übereinstimmungen mit den gemessenen Werten. In die Abtragsfunktion wurde ein Faktor implementiert, der die Intensität des Grazings im Fließgewässer beschreibt. Damit kann das Modell an die vorherrschenden Bedingungen in anderen Fließgewässern angepasst werden. In Fließgewässern mit einer geringen Abundanz an grazenden Organismen können auch während der Sommermonate hohe Biofilmdicken erreicht werden, wie durch die Untersuchungen im South-Saskatchewan-River gezeigt werden konnte. Die Intensität des Grazings ist somit der wichtigste Faktor für die Struktur und Zusammensetzung des benthischen Biofilms in kleinen Fließgewässern. Dies wird auch durch die Simulation bestätigt. Ferner besitzen die Lichtbedingungen sowie die Wassertemperatur einen großen Einfluss.

Weiterhin sollte der Einfluss der Aufwuchsoberfläche auf den benthischen Biofilm untersucht werden. Nach einer längeren Exposition zeigten sich keine Unterschiede in der Biofilmstruktur und Zusammensetzung zwischen Biofilmen gewachsen auf Steinen und Biofilmen gewachsen auf Polykarbonatobjektträgern in der Ehle. Ebenfalls waren die Struktur und Zusammensetzung des benthischen Biofilms auf Holz und Muschelschalen aus dem South-Saskatchewan-River vergleichbar. In den Sauerstoffkonzentrationsprofilen und den photosynthetischen Aktivitäten wurden geringe Unterschiede zwischen den beiden Substraten festgestellt, welche auf eine höhere heterotrophe Biomasse in den Biofilmen gewachsen auf Holz hindeuten.

Untersuchungen in Biofilmreaktoren zeigten den Einfluss der hydrodynamischen Bedingungen sowie der Ammoniumkonzentration auf den Biofilm. Unterschiedliche hydrodynamische Bedingungen beeinflussen die Struktur der Biofilme. Bei einer hohen hydrodynamischen Beanspruchung richten sich die Biofilmkomponenten parallel zur Fließrichtung aus und bilden so genannte „ridges“. Die Biofilmdicke sowie die einzelnen Biofilmkomponenten werden nur gering von den hydrodynamischen Bedingungen

beeinflusst. Dahingegen bewirken unterschiedliche Ammoniumkonzentrationen eine Veränderung der Biofilmmzusammensetzung. Eine Zugabe von Ammonium zum Flusswasser führt zu einer Zunahme der Biofilmdicke sowie der Volumen an Algen, Bakterien und Glykokonjugaten im Reaktorbiofilm. Generell weisen Reaktorbiofilme einen wesentlich geringeren Anteil an photoautotrophen Mikroorganismen auf, da die Lichtbedingungen in Rotating Annular Reaktoren für diese Mikroorganismen unzureichend sind.

Natürliche Biofilme gewachsen in der Flussmitte zeichneten sich durch einen wesentlich höheren Anteil an photoautotrophen Mikroorganismen gegenüber Biofilmen vom Flussrand aus. Damit verbunden waren deutlich höhere Sauerstoffkonzentrationen im gesamten Biofilm sowie eine höhere photosynthetische Aktivität. Dabei war es unerheblich auf welchen Substraten die Biofilme aufgewachsen waren. Es wird vermutet, dass die gefundenen Unterschiede zwischen den benthischen Biofilmen aus der Flussmitte und vom Flussrand weniger durch die Stärke der hydrodynamischen Beanspruchung als vielmehr von der besseren Nährstoffversorgung der Biofilme in der Hauptströmung verursacht wurden.

Durch die Integration der aus den CLSM-Untersuchungen ermittelten Verteilung der Biomasse der photoautotrophen Mikroorganismen sowie der Mikroelektrodenmessungen in ein Biofilmmodell konnten die Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Biofilmschichten sowie die volumenbezogenen Brutto-Photosyntheseraten sehr gut simuliert werden. Die CLSM-Untersuchungen bieten somit die Möglichkeit Aussagen zum Sauerstoffhaushalt in Biofilmen zu treffen.

Die vorliegende Arbeit liefert 2 Biofilmmodelle zum besseren Verständnis von Fließgewässerbiofilmen. Mit dem ersten Modell kann die jahreszeitliche Entwicklung des benthischen Biofilms durch Integrieren des Biomasseabtrages durch weidende Organismen beschrieben werden. Das zweite Modell simuliert aus der vertikalen Verteilung der Biofilmkomponenten die Sauerstoffkonzentrationen in jeder Biofilmschicht. Beide Modelle tragen zur Verbesserung von bestehenden Fließgewässernmodellen bei, welche noch immer von einer konstanten Biofilmdicke während des gesamten Jahres sowie von einer gleichmäßigen Verteilung der Biofilmkomponenten im Biofilm ausgehen.

6 Summary

In present work, the structure and development of benthic biofilms in a creek was investigated in the course of a year. By using confocal laser scanning microscopy it could be shown that the composition of the biofilm as well as its structure varied strongly and had a severe seasonal dependence. In spring the biofilms were characterized by a high heterogeneity, a complex structure and a high diversity of bacteria and diatoms. During the summer months the biofilms showed only a planar structure of a few μm in thickness and a low diversity of diatoms. During this period the largest part of the biovolume was calculated for the cyanobacteria. However, in other seasons, the cyanobacteria showed a very small biovolume. The modification of the benthic biofilm was caused by the population dynamics of grazing organisms, which grazed the biofilm constantly during the summer months and left only a thin layer of cyanobacteria. In this period many biofilms showed a characteristic grazing pattern. In fall and winter with a decreasing grazing pressure, the biofilm thickness, the biovolume of algae, bacteria and glycoconjugates as well as the complexity of the biofilm increased continuously.

The seasonal change of thickness and composition of the benthic biofilm in the creek Ehle, Germany could be simulated successfully with the program AQUASIM. The process equations employed for simulation were formulated close to the IWA River Water Quality Model No. 1. The biomass removal through the grazing macrozoobenthos could be realized by an additional removal function. The simulated development of the biofilm showed excellent agreements with the measured values. Into the removal function, a factor which describes the strength of grazing, in rivers was implemented. By this means, the model could be fitted to the prevailing conditions in other river systems. In lotic systems with a low abundance of grazing organisms high biofilm thicknesses could be found during the summer months. This has been shown during an investigation in the South-Saskatchewan-River, Canada. Consequently, the strength of grazing is the most important factor for structure and composition of the benthic biofilm in small rivers and creeks. This was also confirmed by the simulation. Furthermore, the light conditions as well as the water temperature have a large influence on the benthic biofilm.

Furthermore, the influence of the substratum on the benthic biofilm has been examined. After a long exposure in the river Ehle, no differences appeared in the biofilm structure and composition if biofilms grown on stones and biofilms grown on polycarbonate slides were compared. The structure and composition of the benthic biofilm on wood and shells from the South-Saskatchewan-River was also rather similar. Nevertheless, if the oxygen concentration profiles and the photosynthetic activities were compared, small differences between the two substratums were found which indicated a higher heterotrophic biomass in the biofilms grown on wood.

Investigations in rotating annular reactors run with river water showed the influence of hydrodynamic conditions as well as ammonium concentration on biofilm development. In case of a high hydrodynamic stress, the biofilm components arranged themselves parallel to the direction of flow and form ridges. The biofilm thickness as well as the individual components is only influenced to a low degree by the hydrodynamic conditions. On the other hand, different ammonium concentrations caused a modification of biofilm composition. Addition of ammonium to river water caused an increase in biofilm thickness as well as in volumes of algae, bacteria and glycoconjugates. In general, reactor biofilms showed a considerably lower percentage of photoautotrophic microorganisms. This was caused by the light conditions which were inadequate for the photoautotrophic community.

Natural biofilms grown in the middle of the river were characterized by a considerably higher percentage of photoautotrophic microorganisms if compared with biofilms grown on the edge of the river. Similarly, biofilms in the middle of the river had a higher oxygen concentration as well as a higher photosynthetic activity. This difference was independent of the substratum the biofilm was grown on. It is suggested that the differences found between benthic biofilms grown in middle of the river and on the edge of the river were not caused by the strength of the hydrodynamic conditions but rather by the improved supply of nutrients.

By combining CLSM and microelectrode measurements and integrating the data into a biofilm model, the oxygen concentration and the gross photosynthetic rates could be simulated. Consequently this combined approach allows the prediction of the oxygen budget in benthic biofilms.

The present work supplied two biofilm models for an improved understanding of river biofilms. The seasonal development of the benthic biofilm could be described with the first model by integrating biomass removal caused by grazing organisms. The second model simulated the oxygen concentrations from the vertical distribution of the various biofilm components in every single biofilm layer. Both models contributed to an improvement of existing river models which are still operated with a constant biofilm thickness during the whole year as well as a homogeneous distribution of the different biofilm components.

7 Abkürzungsverzeichnis

2-d	zwei-dimensional	
3-d	drei-dimensional	
Abb.	Abbildung	
avg	durchschnittlich	
BTM	Biotrockenmasse	(g)
c	Konzentration eines gelösten Stoffes	(g/m ³)
c _B	Konzentration eines gelösten Stoffes in der Bulkphase	(g/m ³)
c _F	Konzentration eines gelösten Stoffes an der Biofilmoberfläche	(g/m ³)
c _{O₂}	Sauerstoffkonzentration	(g/m ³)
c _S	Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs	(g/m ³)
CLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie	
D	Diffusionskoeffizient	(m ² /s)
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff	(mg/l)
DWD	Deutscher Wetter Dienst	
EPS	extracelluläre polymere Substanzen	
H	heterotrophe Bakterien	
I	inerte Substanzen	
I _G	Grazingintensität	
I _{Licht}	Lichtfaktor	
j	Massestromdichte auch flächenbezogene Netto-Photosyntheserate	(g/m ² d)
k _d	Abtragskoeffizient	
k _G	Grazingfaktor	
k _{resp}	Respirationskoeffizient der photoautotrophen Mikroorganismen	(1/s)
k _{resp_H}	Respirationskoeffizient der heterotrophen Mikroorganismen	(1/d)
k _{resp_Photo}	Respirationskoeffizient der photoautotrophen Mikroorganismen	(1/d)
K _{O₂}	Halbsättigungskonstante von Sauerstoff	(g/m ³)
K _S	Halbsättigungskonstante der gelösten organischen Substanzen	(g/m ³)
LF	Biofilmdicke	(m)
LF _{ini}	Startwert Biofilmdicke	(m)
LF _{max}	maximal mögliche Biofilmdicke	(m)
max	maximal	
min	minimal	
N	Anzahl	
NA	Numerische Aperatur	
NH ₄	Ammonium	(mg/l)
O ₂	Sauerstoff	(mg/l)
P _(z)	Bruttophotosynthese	(g/m ³ s)
Photo	photoautotrophe Mikroorganismen	
R _(z)	Respiration	(g/m ³ s)
rpm	Rotationen pro Minute	
r _{xi}	Umsatzrate	(g/m ³ d)
RAR	Rotating Annular Reaktor	
STAU	Staatliches Amt für Umweltschutz	
S	gelöste organische Substanzen	(mg/l)
S-Index	Saprobienindex	
SRP	gelöstes reaktives Phosphat	(mg/l)
t	Zeit	(d)
Temp	Wassertemperatur	(°C)

Temp_20	Bezugstemperatur	(°C)
Temp_M	Temperatur bei der die Aktivität des Makrozoobenthos zunimmt	(°C)
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff	(mg/l)
TP	Gesamtphosphat	(mg/l)
u_F	Geschwindigkeit mit der sich die Biofilmoberfläche senkrecht zur Aufwuchsfläche bewegt	(m/d)
u_{F0}	Anfangsgeschwindigkeit	(m/d)
V_{Biofilm}	Biofilmvolumen	(m ³)
X_i	Konzentration der partikulären Komponente i	(g/m ³)
Y_i	Ertragskoeffizient der Komponente i	(gX/gS)
z	senkrecht zur Aufwuchsfläche stehende Raumkoordinate im Biofilmsystem	(m)
β	Stoffübergangskoeffizient	(m/s ¹)
ρ_i	Biofilmdichte des Stoffes i	(gTS/m ³)
ε_i	Volumenfraktion des Stoffes i im Biofilm	
μ_H	Wachstumsgeschwindigkeit der heterotrophen Mikroorganismen	(1/d)
μ_{Photo}	Wachstumsgeschwindigkeit der photoautotrophen Mikroorganismen	(1/d)

8 Literatur

- Allanson BR (1973) The fine structure of the periphyton of *Chara sp.* and *Potamogeton natens* from Wytham Pond, Oxford and its significance to the macrophyte-periphyton metabolic model of R.G. Wetzel and H.L. Allen. *Freshwater Biology* 3:535-542
- An YH, Friedman RJ (2000) Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications. Humana Press, Totowa,
- Arcangeli JP, Arvin E (1999) Modelling the growth of a methanotrophic biofilm: Estimation of parameters and variability. *Biodegradation* 10:177-191
- Armstrong WM, Garcia-Dias JF (1980) Ion-selective microelectrodes: Theory and technique. *Federation Proceedings* 39:2851-2859
- Bärlocher F (1992) The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Bauernfeind E, Moog O, Weichselbaumer P (1995) Ephemeroptera (Eintagsfliegen). Fauna Aquatica Austriaca. Katalog zur autökologischen Einstufung aquatischer Organismen Österreichs. Herausgegeben im Auftrag des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft. MOOG, Wien,
- Baumgarten CM (1981) An improved liquid ion exchanger for chloride ion-selectives microelectrodes. *American Journal of Physiology* 241:258-263
- Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft (1996) Ökologische Typisierung der aquatischen Makrofauna. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München
- Bazzanti M (1991) Sandy bottom macroinvertebrates in two moderately polluted stations of the River Treia (Central Italy): structural and functional organization. *Annales de Limnologie* 27:287-298
- Bergner S, Pohle R, Al-Zubi S, Tönnis K, Eitner A, Neu TR (2002) Segmenting microorganisms in multi-modal volumetric datasets using a modified watershed transform. In: Van Gool LJ (ed) Pattern Recognition: 24th DAGM Symposium, Zurich, Switzerland, September 16-18, 2002. Proceedings. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 429-437
- Beyenal H, Lewandowski Z (2000) Combined effect of substrate concentration and flow velocity on effective diffusivity in biofilms. *Water Research* 34:528-238
- Block JC (1992) Biofilms in drinking water distribution systems. In: Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (eds) Biofilms - Science and Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 469-485
- Borchardt D, Reichert P (2001) River water quality model no. 1 (RWQM1): Case Study I. Compartmentalisation approach applied to oxygen balances in the River Lahn (Germany). *Water Science and Technology* 43:41-49
- Boyle JD, Scott JA (1984) The role of benthic films in the oxygen balance in an east Devon River. *Water Research* 18:1089-1099

- Bryers JD (2000) *Biofilms II : Process analysis and applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Buffiere P, Steyer JP, Fonade C, Moletta R (1998) Modeling and experiments on the influence of biofilm size and mass transfer in a fluidized bed reactor for anaerobic digestion. *Water Research* 32:657-668
- Buffle J, Horvai G (2000) *In situ monitoring of aquatic systems*. John Wiley & Sons, Chichester
- Cattaneo A (1978) The microdistribution of epiphytes on the leaves of natural and artificial macrophytes. *British Phycological Journal* 13:183-188
- Cattaneo A, Kalff J (1979) Primary production of algae growing on natural and artificial aquatic plants: A study of interactions between epiphytes and their substrate. *Limnology and Oceanography* 24:1031-1037
- Characklis WG (1973a) Attached microbial growth - I. Attachment and growth. *Water Research* 7:1113-1127
- Characklis WG (1973b) Attached microbial growth - II Frictional resistance due to microbial slime. *Water Research* 7:1249-1258
- Characklis WG, Marshall KC (1990a) *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Characklis WG, Marshall KC (1990b) *Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach*. In: Characklis WG, Marshall KC (eds) *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York, pp. 3-15
- Chen GH, Ozaki H, Terashima Y (1989) Modelling of the simultaneous removal of organic substances and nitrogen in a biofilm. *Water Science and Technology* 21:791-804
- Chen YS, Bungay HR (1981) Microelectrode studies of oxygen transfer in trickling filter slimes. *Biotechnology and Bioengineering* 23:781-792
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews Microbiology* 41:435-464
- Cronenberg CCH, Van den Heuvel JC (1991) Determination of glucose diffusion coefficient in biofilms with microelectrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 6:255-262
- Cundell AM, Mitchell R (1977) Microbial succession on a wooden surface exposed to the sea. *International Biodeterioration Bulletin* 13:67-73
- Doyle RJ, Ofek I (1995) *Adhesion of microbial pathogens*. Academic Press, San Diego
- Eberl HJ, Picioreanu C, Heijnen JJ, van Loosdrecht MCM (2000) A three-dimensional numerical study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms. *Chemical Engineering Science* 55:6209-6222
- Epping EHG, Jørgensen BB (1996) Light-enhanced oxygen respiration in benthic phototrophic communities. *Marine Ecology Progress Series* 139:193-203

- Flemming HC, Szewzyk U, Griebe T (2000) Biofilms: Investigative methods & applications. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster
- Flemming HC, Wingender J (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 43:1-8
- Flemming HC, Wingender J (2002) Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide ... *Chemie in unserer Zeit* 36:30-42
- Friese K, Mages M, Wendt-Potthoff K, Neu TR (1997) Determination of heavy metals in biofilms from the river Elbe by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 52:1019-1025
- Geesey GG, Lewandowski Z, Flemming HC (1994) Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. Lewis Publishers, Boca Raton
- Gessner MO, Suberkropp K, Chauvet E (1997) Decomposition of plant litter by fungi in marine and freshwater ecosystems. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota, Vol. IV: Environmental and Microbial Relationships*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 303-322
- Gjaltema A, Arts PAM, van Loosdrecht MCM, Kuenen JG, Heijnen JJ (1994) Heterogeneity of biofilms in Rotating Annular Reactors: Occurrence, structure, and consequences. *Biotechnology and Bioengineering* 44:194-204
- Glud RN, Ramsing NB, Revsbech NP (1992) Photosynthesis and photosynthesis-coupled respiration in natural biofilms quantified with oxygen microsensors. *Journal of Phycology* 1992:51-60
- Glud RN, Jensen K, Revsbech NP (1995) Diffusivity in surficial sediments and benthic mats determined by use of a combined N₂O-O₂ microsensor. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59:231-237
- Goll D (2001) Modulierung der Sorptionseigenschaften von Biofilmsystemen. Diplomarbeit an der FH Magdeburg-Stendal,
- Gujer W, Wanner O (1990) Modeling mixed population biofilms. In: Characklis WG, Marshall KC (eds) *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York, pp. 397-445
- Haack TK, McFeters GA (1982) Microbial dynamics of an epilithic mat community in a high alpine stream. *Applied and Environmental Microbiology* 43:702-707
- Hall ER (1987) Biofilm reactors in anaerobic wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 5:257-269
- Hao X, Heijnen JJ, van Loosdrecht MCM (2002) Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnology and Bioengineering* 77:266-277
- Hauer FR, Lamberti GA (1996) *Methods in stream ecology*. Academic Press, Inc., San Diego

- Hermanowicz SW (1998) A model of two-dimensional biofilm morphology. *Water Science and Technology* 37:219-222
- Hermanowicz SW (1999) Two-dimensional simulations of biofilm development: Effects of external environmental conditions. *Water Science and Technology* 39:107-114
- Hermanowicz SW, Schindler U, Wilderer P (1995) Fractal structure of biofilms: New tools for investigation of morphology. *Water Science and Technology* 32:99-105
- Heydorn A, Ersboll BK, Hentzer M, Parsek MR, Givskov M, Molin S (2000a) Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology* 146:2409-2415
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S (2000b) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146:2395-2407
- Hoagland KD, Roemer SC, Rosowski JR (1982) Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (*Bacillariophyceae*). *American Journal of Botany* 69:188-213
- Horn H (1995) Substratumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen: Quantitative Messung und Modellierung. Dissertation an der Universität Kassel,
- Horn H (1999) RIOVAL: A management tool for water quality modelling in small streams. In: Anagnostopoulos P, Brebbia CA (eds) *Water Pollution V*. WIT Press, Southampton, pp. 151-160
- Horn H, Hempel DC (1995) Mass transfer coefficients for an autotrophic and a heterotrophic biofilm system. *Water Science and Technology* 32:199-204
- Horn H, Hempel DC (1996) Modellierung von Substratumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen. *gwf - Wasser/Abwasser* 137:293-301
- Horn H, Hempel DC (1997a) Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. *Water Research* 31:2243-2252
- Horn H, Hempel DC (1997b) Substrate utilization and mass transfer in an autotrophic biofilm system: experimental results and numerical simulation. *Biotechnology and Bioengineering* 53:363-371
- Horn H, Hempel DC (1998) Modeling mass transfer and substrate utilization in the boundary layer of biofilm systems. *Water Science and Technology* 37:139-147
- Horn H, Neu TR, Wulkow M (2001) Modelling the structure and function of extracellular polymeric substances in biofilms with new numerical techniques. *Water Science and Technology* 43:121-127
- Horn H, Reiff H, Morgenroth E (2003) Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 81:607-617
- Horn H, Wulkow M (1996) Modellierung von Einleitungen in kleine Fließgewässer. *gwf - Wasser/Abwasser* 137:557-564

- Horner RR, Welch EB (1981) Stream periphyton development in relation to current velocity and nutrients. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38:449-457
- Hudon C, Bourget E (1981) Initial colonization of artificial substrate: community development and structure studied by scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38:1371-1384
- Hunter RD (1980) Effects of grazing on the quantity and quality of freshwater Aufwuchs. *Hydrobiologia* 69:215-259
- Iza J (1991) Fluidized bed reactors for anaerobic wastewater treatment. *Water Science and Technology* 24:109-132
- Jackson G, Beyenal H, Rees WM, Lewandowski Z (2001) Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *Journal of Microbiological Methods* 47:1-10
- Kalmbach S, Manz W, Szewzyk U (1997) Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology* 22:265-279
- Kalmbach S. (1998) Polyphasic characterization of the microbial population of drinking water biofilms. Dissertation an der Technische Universität Berlin.
- Kaplan LA, Bott TL (1982) Diel fluctuations of DOC generated by algae in a piedmont stream. *Limnology and Oceanography* 27:1091-110
- Kaplan LA, Bott TL (1989) Diel fluctuations in bacterial activity on streambed substrata during vernal algal booms: Effects of temperature, water chemistry, and habitat. *Limnology and Oceanography* 34:718-733
- Karsten U, Kühl M (1996) Die Mikrobenmatte - das kleinste Ökosystem der Welt. *Biologie in unserer Zeit* 1:16-26
- Kloep F, Röske I, Neu TR (2000) Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. *Water Research* 34:311-319
- Korte VL, Blinn DW (1983) Diatom colonization on artificial substrata in pool and riffle zones studied by light and scanning electron microscopy. *Journal of Phycology* 19:332-341
- Kreft JU, Wimpenny JWT (2001) Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Science and Technology* 43:135-141
- Krumbein WE, Paterson DM, Stal LJ (1994) Biostabilization of sediments. BIS-Verlag, Oldenburg
- Krumbein WE, Villbrandt M (1993) Biofilme und Mikrobenmatten extremer Lebensräume. In: Hausmann K, Kremer BP (eds) *Extremophile. Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 113-140

- Kuehn M, Mehl M, Hausner M, Bungartz HJ, Wuertz S (2001) Time-resolved study of biofilm architecture and transport processes using experimental and simulation techniques: the role of EPS. *Water Science and Technology* 43:143-151
- Kuenen JG, Jørgensen BB, Revsbech NP (1986) Oxygen microprofiles of trickling filter biofilm. *Water Research* 20:1589-1598
- Kühl M, Jørgensen BB (1992) Spectral light measurements in microbenthic phototrophic communities with a fiber-optic microprobe coupled to a sensitive diode array detector. *Limnology and Oceanography* 37:1813-1823
- Kühl M, Jørgensen BB (1994) The light field of microbenthic communities: Radiance distribution and microscale optics of sandy coastal sediments. *Limnology and Oceanography* 39:1368-1398
- Kühl M, Glud RN, Ploug H, Ramsing NB (1996) Microenvironmental control of photosynthesis and photosynthesis-coupled respiration in an epilithic cyanobacterial biofilm. *Journal of Phycology* 32:799-812
- Lamb MA, Lowe RL (1981) A preliminary investigation of current speed on periphyton community structure. *Micron* 12:211-212
- Lamb MA, Lowe RL (1987) Effects of current velocity on the physical structuring of diatom (Bacillariophyceae) communities. *The Ohio Journal of Science* 87:72-78
- LaMotta EJ (1976) Internal diffusion and reaction in biological films. *Environmental Science and Technology* 10:765-769
- Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt (1997). Fließgewässerprogramm Sachsen-Anhalt, Band 6: Verbindungsgewässer Ehle.
- Lau YL (1990) Modelling the consumption of dissolved contaminants by biofilm periphyton in open-channel flow. *Water Research* 24:1269-1274
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology* 173:6558-6567
- Lawrence JR, Wolfaardt GM, Neu TR (1998a) The study of biofilms using confocal laser scanning microscopy. In: Wilkinson MHF, Schut F (eds) *Digital Analysis of Microbes: Imaging, Morphometry, Fluorometry and Motility Techniques and Applications*. Sussex, Uk, pp. 431-465
- Lawrence JR, Neu TR, Swerhone GDW (1998b) Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 32:253-261
- Lawrence JR, Neu TR (1999) Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods in Enzymology* 310:131-144
- Lawrence JR, Scharf B, Packroff G, Neu TR (2002) Microscale evaluation of the effects of grazing by invertebrates with contrasting feeding modes on river biofilm architecture and composition. *Microbial Ecology* 42:199-207

- Lewandowski Z, Webb D, Hamilton M, Harkin G (1999) Quantifying biofilm structure. *Water Science and Technology* 39:71-76
- Liu Y, Lam MC, Fang HHP (2001) Absorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Science and Technology* 43:59-66
- Lock MA (1993) Attached microbial communities in rivers. In: Ford TE (ed) *Aquatic Microbiology: an ecological approach*. Blackwell Scientific Publications, Boston, pp. 113-138
- Lock MA, Wallace RR, Costerton JW, Ventullo RM, Charlton SE (1984) River epilithos: toward a structural-functional model. *Oikos* 42:10-22
- Lock MA, Williams DD (1981) *Perspectives in running water ecology*. Plenum Press, New York
- Lowe RL, Gale WF (1980) Monitoring river periphyton with artificial benthic substrates. *Hydrobiologia* 69:235-244
- Luttenton ML, Vansteenburg JB, Rada RG (1986) Phycoperiphyton in selected reaches of the Upper Mississippi River: community composition, architecture, and productivity. *Hydrobiologia* 136:31-46
- Manz W, Arp G, Schumann-Kindel G, Szewzyk U, Reitner J (2000) Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *Journal of Microbiological Methods* 40:125-134
- Manz W, Eisenbrecher M, Neu TR, Szewzyk U (1998) Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology* 25:43-61
- Manz W, Wendt-Potthoff K, Neu TR, Szewzyk U, Lawrence JR (1999) Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microbial Ecology* 37:225-237
- Marshall KC (1976) *Interfaces in microbial ecology*. Harvard University Press, Cambridge MA
- McDonald DV (1990) Denitrification by fluidized biofilm reactor. *Water Science and Technology* 22:451-461
- Melo LF, Bott TR, Flechter M, Capdeville B (1992) *Biofilms - Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Munteanu N, Maly EJ (1981) The effect of current on the distribution of diatoms settling on submerged glass slides. *Hydrobiologia* 78:273-282
- Murga R, Stewart PS, Daly D (1995) Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnology and Bioengineering* 45:503-510

- Nagel G (1989) Bildbestimmungsschlüssel der Saprobien: Makrozoobenthon. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Nesemann H, Reischütz P (1995) Mollusca: Gastropoda (Schnecken). Fauna Aquatica Austriaca. Katalog zur autökologischen Einstufung aquatischer Organismen Österreichs. Herausgegeben im Auftrag des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft. MOOG, Wien,
- Neu TR (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews* 60:151-166
- Neu TR (1999) Microbial "footprints" and the general ability of microorganisms to label interfaces. *Canadian Journal of Microbiology* 38:1005-1008
- Neu TR (2000a) *In situ* cell and glycoconjugate distribution in river snow studied by confocal laser scanning microscopy. *Aquatic Microbial Ecology* 21:85-95
- Neu TR (2000b) Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) von Biofilm-Systemen. *Biospektrum* 3:189-193
- Neu TR, Lawrence JR (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 24:11-25
- Neu TR, Lawrence JR (1999) Lectin-binding analysis in biofilm systems. *Methods in Enzymology* 310:145-152
- Neu TR, Kuhlicke U (2001) Anwendungen der 2-Photonen Laser Scanning Mikroskopie in der Mikrobiologie. *Biospektrum* 4:379-382
- Neu TR, Lawrence JR (2002) Laser scanning microscopy in combination with fluorescence techniques for biofilm study. In: Bitton G (ed) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1772-1788
- Neu TR, Eitner A, Paje MLF (2003) Development and architecture of complex environmental biofilms – lotic biofilm systems. In: Krumbein WE, Paterson DM, Zavarzin GA (eds) *Fossil and recent biofilms, a natural history of life on earth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp (in press)
- Neudörfer F, Meyer-Reil LA (1998) Kleinräumige Bestimmung respiratorischer und photosynthetischer Prozesse mit Sauerstoffmikroelektroden in Sedimenten. In: Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) (ed) *Mikrobiologische Charakterisierung aquatischer Sedimente*. R. Oldenbourg Verlag GmbH, München, pp. 245-260
- Nickel JC, Wright JB, Ruseska I, Marrie TJ, Whitfield C, Costerton JW (1985) Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro. *European Journal of Clinical Microbiology* 4:213-218
- Nielsen PH, Jahn A (1999) Extraction of EPS. In: Wingender J, Neu TR, Flemming CA (eds) *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin, pp. 49-72
- Noguera DR, Okabe S, Picioreanu C (1999a) Biofilm modeling: present status and future directions. *Water Science and Technology* 39:273-278

- Noguera DR, Pizarro G, Stahl DA, Rittmann BE (1999b) Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions. *Water Science and Technology* 39:123-130
- Olschewski F (2000) Software in confocal microscopy. *Centre for Development Research* 4:28-77
- Paerl HW (1980) Attachment of microorganisms to living and detrital surfaces in freshwater systems. In: Bitton G, Marshall KC (eds) *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*. John Wiley & Sons, New York, pp. 375-402
- Paje MLF, Kuhlicke U, Neu TR (2002) Inhibition of lotic biofilms by diclofenac. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:488-492
- Pauer JJ, Auer MT (2000) Nitrification in the water column and sediment of a hypereutrophic lake and adjoining river system. *Water Research* 34:1247-1254
- Paul RW, Kuhn DL, Plafkin JL (1977) Evaluation of natural and artificial substrate colonization by scanning electron microscopy. *Transactions of the American Microscopical Society* 96:506-519
- Pawley JB (1995) *Handbook of biological confocal microscopy*, 2 edn. Plenum Press, New York
- Perkins MA, Kaplan LA (1978) Epilithic periphyton and detritus studies in a subalpine stream. *Hydrobiologia* 57:103-109
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1999) Discrete - differential modelling of biofilm structure. *Water Science and Technology* 39:115-122
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (2000a) Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: A two-dimensional modeling study. *Biotechnology and Bioengineering* 69:504-515
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (2000b) Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and Bioengineering* 72:205-218
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (2000c) A theoretical study on the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 68:355-369
- Porwol T, Strohmaier AR (2000) Fluorescence Lifetime Imaging als neues Kontrastverfahren in der Konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie. *Biospektrum* 5:412-415
- Pringault O, Garcia-Pichel F (2000) Monitoring of oxygenic and anoxygenic photosynthesis in a unicyanobacterial biofilm, grown in benthic gradient chamber. *FEMS Microbiology Ecology* 33:251-258
- Rauch W, Vanrolleghem PA (1998) Modelling benthic activity in shallow eutrophic rivers. *Water Science and Technology* 37:129-137

- Reichert P (1994) Concepts underlying a computer program for the identification and simulation of aquatic systems (AQUASIM 1.0). Bd. 7. Dübendorf: Schriftenreihe der EAWAG,
- Reichert P (2001) River water quality model no. 1 (RWQM1): Case Study II. Oxygen and nitrogen conversion processes in the River Glatt (Switzerland). *Water Science and Technology* 43:51-60
- Reichert P, Borchardt D, Henze M, Rauch W, Shanahan P, Somlyódy L, Vanrolleghem P (2001) River water quality model no. 1 (RWQM1): 2. Biochemical process equations. *Water Science and Technology* 43:11-30
- Reiter MA, Carlson RE (1986) Current velocity in streams and the composition of benthic algal mats. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:1156-1162
- Revsbech NP (1989) An oxygen microelectrode with a guard cathode. *Limnology and Oceanography* 34:474-478
- Revsbech NP, Jørgensen BB (1981) Primary production of microalgae in sediments measured by oxygen microprofile, $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ fixation, and oxygen exchange methods. *Limnology and Oceanography* 26:717-730
- Revsbech NP, Jørgensen BB (1986) Microelectrodes: Their use in microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* 9:293-352
- Rittmann BE, Manem JA (1992) Development and experimental evaluation of a steady-state, multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering* 39:914-922
- Roemer SC, Hoagland KD, Rosowski JR (1984) Development of a freshwater periphyton community as influenced by diatom mucilages. *Canadian Journal of Botany* 62:1799-1813
- Schlessinger D (1982) Bacterial adhesion in pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington
- Shanahan P, Borchardt D, Henze M, Rauch W, Reichert P, Somlyódy L, Vanrolleghem P (2001) River water quality model no. 1 (RWQM1): 1. Modelling approach. *Water Science and Technology* 43:1-9
- Shearer CA (1992) The role of woody debris. In: Bärlocher F (ed) *The ecology of aquatic hyphomycetes*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 77-98
- Sheppard CJR, Shotton DM (1997) *Confocal Laser Scanning Microscopy*. BIOS Scientific Publishers,
- Sinsabaugh RL, Linkins AE (1988) Exoenzyme activity associated with lotic epilithon. *Freshwater Biology* 20:249-261
- Sinsabaugh RL, Golladay SW, Linkins AE (1991) Comparison of epilithic and epixylic biofilm development in a boreal river. *Freshwater Biology* 25:179-187
- Smith DJ, Underwood GJC (1998) Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. *Limnology and Oceanography* 43:1578-1591

- Sommer U (2000) Benthic microalgal diversity enhanced by spatial heterogeneity of grazing. *Oecologia* 122:284-287
- Staatliches Amt für Umweltschutz Magdeburg (1997) Jahresbericht 1997 Teil Gewässergüte.
- Stal LJ, Caumette P (1994) *Microbial mats*. Springer, Berlin
- Staudt C, Horn H, Hempel DC, Neu TR (2003) Screening of lectins for staining lectin-specific glycoconjugates in the EPS of biofilms. In: O'Flaherty V, Lens P, Mahoney T, Moran AP, Stoodley P (eds) *Biofilms in medicine, industry and environmental technology*. IWA Publishing, UK, pp. 308-326
- Stewart PS, Peyton BM, Drury WJ, Murga R (1993) Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 59:327-329
- Stock MS, Ward AK (1989) Establishment of a bedrock epilithic community in a small stream: Microbial (algal and bacterial) metabolism and physical structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46:1874-1883
- Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD, Lappin-Scott H (1999) The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environmental Microbiology* 1:447-455
- Surman SB, Walker JT, Goddard DT, Morton LHG, Keevil CW, Weaver W, Skinner A, Hanson K, Caldwell DE, Kurtz J (1996) Comparison of microscopic techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 25:57-70
- Sutherland IW (2001a) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3-9
- Sutherland IW (2001b) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology* 43:77-86
- Tuchman ML, Stevenson RJ (1980) Comparison of clay tile, sterilized rock, and natural substrate diatom communities in a small stream in southeastern Michigan, USA. *Hydrobiologia* 75:73-79
- Vanrolleghem P, Borchardt D, Henze M, Rauch W, Reichert P, Shanahan P, Somlyódy L (2001) River water quality model no. 1 (RWQM1): 3. Biochemical submodel selection. *Water Science and Technology* 43:31-40
- Wanner O, Gujer W (1986) A multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering* 28:314-328
- Waringer J, Graf W (1997) *Atlas der österreichischen Köcherfliegenlarven*. Facultas-Universitätsverlag, Wien
- Wäsche S, Horn H, Hempel DC (2002) Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Research* 36:4775-4784

- Wetzel RG (1964) A comparative study of the primary productivity of higher aquatic plants, periphyton, and phytoplankton in a large, shallow lake. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 49:1-61
- Wilderer P, Characklis WG (1989) Structure and function of biofilms. In: Characklis WG, Wilderer P (eds) *Structure and function of biofilms*. John Wiley & Sons, New York, pp. 5-17
- Williamson K, McCarty PL (1976) A model of substrate utilization by bacteria biofilms. *Journal of Water Pollution Control* 48:9
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24:661-671
- Wingender J, Neu TR, Flemming HC (1999) *Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure, and function*. Springer-Verlag, Berlin
- Wolfaardt GM, Lawrence JR, Headley JV, Robarts RD, Caldwell DE (1994) Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants. *Microbial Ecology* 27:279-291
- Wood BD, Whitaker S (1998) Diffusion and reaction in biofilms. *Chemical Engineering Science* 53:397-425
- Xavier JB, Schnell A, Wuertz S, Palmer R, White DC, Almeida JS (2001) Objective threshold selection procedure (OTS) for segmentation of scanning laser confocal microscope images. *Journal of Microbiological Methods* 47:169-180
- Yang X, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z (2000) Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 39:109-119
- Yang X, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z (2001) Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Water Research* 35:1149-1158
- Young OW (1945) A limnological investigation of periphyton in Douglas Lake, Michigan. *Transactions of the American Microscopical Society* 64:1-20
- Zhang TC, Bishop PL (1994) Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Research* 28:2267-2277
- Zhang X, Bishop PL, Kinkle BK (1999) Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science and Technology* 39:211-218
- ZoBell CE (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 46:39-56